

b) Triacetat aus Haworth-Cellit. Arbeitsgang wie unter a).

Frakt. Nr.	Menge in g	$n_D^{20,0}$	Pentamethyl-glucose	
			%	g
1	2.35	1.45568	9.74	0.229
2	1.3	1.45644	5.33	0.069
3	1.0	1.45665	4.08	0.041
4	0.42	1.45688	2.72	0.011
5	0.18	1.45712	1.34	0.002
			zusammen 0.352 g	

Pentamethyl-glucose aus 50 g Methyl-cellulose entsprechend 0.70 % Endgruppen und einer „Kettenlänge“ von $\sim 140 C_6$.

Acetolysenprodukten verunreinigt war, die im Falle des Cellits eine höhere Endgruppenzahl vortäuschen als im Falle des gereinigten Triacetats. Da auch für das von uns besonders gereinigte Triacetat keine Gewähr gegeben ist, daß es frei von Hydrolysenprodukten ist, so läßt selbst der für dieses Präparat gefundene Endgruppenwert auch nicht näherungsweise einen Schluß auf das Molekulargewicht der Cellulose zu.

Wir danken der I.-G. Farbenindustrie A.-G. für Unterstützung dieser und der folgenden Untersuchungen.

F. Neumann spricht der Justus v. Liebig-Gesellschaft zur Förderung des chemischen Unterrichts für die Gewährung eines Stipendiums seinen aufrichtigen Dank aus.

133. Fritz Neumann und Kurt Hess: Nachweis kleinster Mengen endständiger Gruppen bei Polysacchariden.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Chemie, Berlin-Dahlem.]
(Eingegangen am 4. März 1937.)

Nachdem in der vorangehenden Mitteilung¹⁾ gezeigt worden ist, daß eine quantitative Abtrennung von permethyliertem Zucker aus dem bei der Hydrolyse des methylierten Kohlenhydrates anfallenden Spaltzucker-Gemisch durch Destillation nicht möglich ist, wurde versucht, das Ziel auf chemischem Wege zu erreichen.

Eine Veresterung der hydroxylhaltigen Bestandteile mit organischen Säuren wie *p*-Toluolsulfonsäure, Benzoesäure u. a. hatte nicht den gewünschten Erfolg. Die Eigenschaften der Veresterungsprodukte erwiesen sich gegenüber denen des permethylierten Zuckers als noch nicht verschieden genug, um eine glatte, vollständige Trennung zu ermöglichen. Im besonderen stellte sich heraus, daß sogar in den Fällen, in denen die Veresterungsprodukte praktisch nicht destillierbar waren (*p*-Tosyl-Ester), Anteile des Pentaäthers selbst bis zur Zersetzungstemperatur des Esters vom Rückstand festgehalten wurden, so daß eine quantitative Erfassung unmöglich war. Es wurde daher versucht, die Komponenten so zu verändern, daß sie auf Grund ihrer Löslichkeits-eigenschaften getrennt werden konnten.

¹⁾ K. Hess u. F. Neumann, B. **70**, 710 [1937].

Als bestgeeignet hierfür erwies sich das Bariumsalz des Phosphorsäure-esters, das in Äther und besonders in Petroläther, von denen Pentamethyl-glucose spielend und vollständig aufgenommen wird, unlöslich ist. Dieses Verfahren bietet außerdem noch den großen Vorteil, daß man bei der Wahl des Ausgangsmaterials nicht auf vollständig methylierte Kohlenhydrate angewiesen ist — die im Falle der Cellulose doch nicht unmittelbar gewonnen werden können²⁾ —, indem durch die Phosphorylierung auch alle mindermethylierten Zucker in unlösliche Anteile übergehen. In Lösung verbleibt ausschließlich die Pentamethyl-glucose, was namentlich für die quantitative Erfassung kleinster Mengen von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Da nach den Erfahrungen der vorangehenden Untersuchung die Frage nach der Existenz von Endgruppen nur an den Naturstoffen unmittelbar geprüft werden kann, kommt als Ausgangsmaterial für die Methylierung nur die natürliche Faser in Frage. Um für den vorliegenden Zweck störende Einflüsse bei der Methylierung auszuschließen, wurde ein Verfahren gewählt, bei dem unter Luftausschluß in möglichst kurzer Zeit (in einem einzigen Ansatz) ein möglichst hoher Methoxylgehalt (durchschnittlich 42%) erreicht wird.

Bei einem Methoxylgehalt von 42% sind nach der Mischungsregel bei etwa 72% der Cellulose alle freien Hydroxylgruppen, also auch die der endständigen Glucosereste veräthert. Der gefundene Endgruppen-Wert ist infolgedessen nur auf 72% des Ausgangsmaterials zu beziehen. 42% OCH₃ statt des theoretischen Gehaltes von 45.6% reichen für die Endgruppen-Bestimmung aber vollständig aus. Von einer Erhöhung des Methoxylgehaltes, die in nennenswertem Umfange erwiesenermaßen nur durch mehrmalige Wiederholung der Methylierung erfolgen kann, haben wir abgesehen, weil die dadurch vergrößerte Gefahr störender Einflüsse nicht von dem geringen Vorteil eines theoretischen Methoxylgehaltes aufgewogen wird.

Der weitere Arbeitsgang geht aus folgender Übersicht des gesamten Verfahrens hervor:

Kohlenhydrat → Methylierungsprodukt → 42-proz. HCl—H₂O, Spaltzucker-Gemisch → 1-proz. HCl — CH₃OH, Methyl-glucoside → Abtrennung der Hauptmenge mindermethylierter Zucker durch ein-, höchstens zweimalige fraktionierte Destillation → Glucosidspaltung (5-proz. HCl — H₂O) zwecks Abtrennung der Hauptmenge an 2.3.6-Trimethyl-glucose durch Krystallisation → 1-proz. HCl — CH₃OH, Methyl-glucoside des Mutterlaugen-Rückstandes → POCl₃ — Pyridin, danach Ba(OH)₂, Ba-Salze der Phosphorsäure-Ester → Äther, Petroläther, Abtrennung des nicht veresterbaren Zucker-Anteiles (Endgruppen).

Zur völligen Reinigung wird der nicht veresterbare (weil völlig methylierte) Zucker in konzentrierter Benzol-Lösung mit metallischem Natrium behandelt und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels über Natrium im Vakuum (~ 10⁻³ mm, 40—60° Badtemp.) destilliert.

²⁾ K. Hess, G. Abel, W. Schön u. W. Komarewsky, *Cellulosechem.* **16**, 69 [1935].

Da bei der Destillation Verluste durch Hängenbleiben von Substanz an den Kolbenwänden vermieden werden mußten, wurden die in Fig. 1 und 2 wiedergegebenen Vorrichtungen benutzt. Durch gleichmäßiges Erhitzen der gesamten Kolbenwand (Ölbad bis Ansatzrohr!) wird erreicht, daß alle

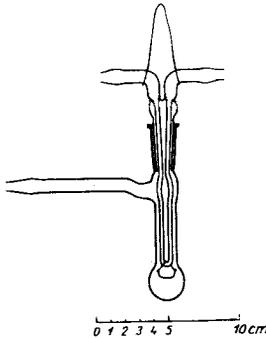


Fig. 1. Gefäß zur quantitativen Bestimmung von 2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid durch Destillation bei Mengen von etwa 3—35 mg.

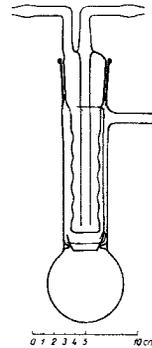


Fig. 2. Gefäß zur quantitativen Bestimmung von 2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid durch Destillation bei Mengen über 35 mg (erprobt bis etwa 500 mg).

Substanz ausschließlich an dem tief in den Kolbenhals hineinragenden Kühler kondensiert wird und nach dem Trocknen des Kühlrohrs (durchspülen mit Aceton und Luft durchsaugen) noch am Kühler hängend, unmittelbar gewogen werden kann. Ist die destillierte Menge so groß, daß ein Teil vom Kühler wieder herabtropft, so empfiehlt es sich, entsprechend Fig. 1 oder 2 ein Auffanggefäß anzubringen. Zu Beginn der Destillation schlägt sich dann zwar etwas Substanz an der Außenwand des noch kühlen Schälchens nieder, verdampft aber mit zunehmender Erwärmung von den Auflagestellen her und kondensiert sich am Kühler. Durch die Vorrichtung entsprechend Fig. 1 ist man in der Lage, selbst wenige mg Methyl-zucker quantitativ zu erfassen.

Das beschriebene Verfahren wurde durch Untersuchung künstlicher Mischungen zunächst aus reinem 2.3.6-Trimethyl-methyl-glucosid und 2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid auf seine Leistungsfähigkeit geprüft.

Nr.	Mischung:		Wiedergewonnen ^{a)}
	2.3.6-Trimethyl-methyl-glucosid in mg	2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid in mg	2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid in mg
1	21451.3	10.6	6.2 (Verlust 4.4)
2	32876.4	32.4	28.7 (Verlust 3.7)

^{a)} Die wiedergewonnene Menge an Pentazucker würde einer Kettenlänge in C₅ bei Versuchs-Nr. 1 von 2000, bei Versuchs-Nr. 2 von 1000 entsprechen.

Die Identifizierung der wiedergewonnenen Pentamethyl-glucose erfolgte durch den Methoxylgehalt⁴⁾, bei größeren Mengen auch durch den Brechungsindex sowie den Methoxylgehalt des Verseifungsproduktes (Tetramethyl-glucose), das im Gegensatz zum Pentaäther kristallisiert ist und das zweckmäßig ebenfalls in einem Gefäß entspr. Fig. 1 bzw. 2 destilliert wird.

Die Methode gewährleistet also unter allen Umständen, zu entscheiden, ob und wieviel endständige Gruppen in einem Polysaccharid enthalten sind. Unsere Erfahrungen, über die in der nächsten Mitteilung berichtet wird, beziehen sich zunächst auf Cellulose. Selbstverständlich läßt sich das Verfahren auch auf andere Kohlenhydrate anwenden, womit wir z. Zt. beschäftigt sind.

Beschreibung der Versuche.

Methylierung⁶⁾: Die Methylierung erfolgt zweckmäßig unter Verwendung der in Fig. 3 schematisch wiedergegebenen Anordnung in

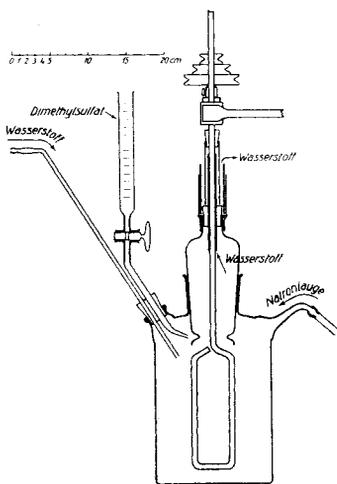


Fig. 3. Vorrichtung zum Methylieren von Cellulose unter Ausschluß von Luft-sauerstoff.

Wasserstoff-Atmosphäre. 20 g des in sauerstofffreier Atmosphäre aufbewahrten und gegebenenfalls ebenso unter Ausschluß von Sauerstoff⁵⁾ gereinigten Kohlenhydrates (bei Fasern 2 bis 3 mm lange Stapel) werden im Methylierungsgefäß im Wasserstoffstrom nochmals entlüftet (Gas-Zuführung bis auf den Boden des Gefäßes, Dauer etwa 2 Stdn). Das Gas-Zuführungsrohr wird vor dem Zugeben der ebenfalls sorgfältig entlüfteten Lauge (2 l 45-proz. NaOH) hochgezogen. Bei 60° und einer Rührgeschwindigkeit von etwa 700 Touren/Min. werden 200 ccm Dimethylsulfat in Portionen von je 20 ccm in Abständen von 15 Min. zugegeben. Nach der letzten Zugabe wird noch 1 Stde. bei 60° gerührt. Dann wird über Nacht im langsamen Wasserstoff-Strom erkalten gelassen⁷⁾.

⁴⁾ vergl. F. Neumann, B. 70, 734 [1937].

⁵⁾ Über eine von Dr. E. Leckzyck in unserem Laboratorium ausgearbeitete Methode zur Durchführung von Faser-Reinigungen unter praktisch völligem Ausschluß von Luft wird gelegentlich einer der späteren Veröffentlichungen über die Endgruppen-Untersuchung an Polysacchariden berichtet.

⁶⁾ vergl. hierzu die für die verschiedenen Zwecke angegebenen Methylierungsvorschriften bei K. Hess, G. Abel, W. Schön u. W. Komarewsky, l. c., S. 69/70.

⁷⁾ Es ist zweckmäßig, die Nachtpause in dieser Weise zu benutzen, da erfahrungsgemäß bei längerem Stehenlassen des Ansatzes nach vollzogener Methylierung noch eine gewisse Zunahme des Methoxylgehaltes erfolgt.

Aus Fig. 4 geht hervor, daß nach Zugabe von insgesamt 200 ccm Dimethylsulfat die Methoxyaufnahme unter diesen Bedingungen praktisch beendet ist. Das Methylierungsprodukt wird nach dem Abpressen der Lauge 4-mal mit je 1 l heißem Wasser, dann mit Aceton, zuletzt mit Äther gewaschen. Trocknen an der Luft.

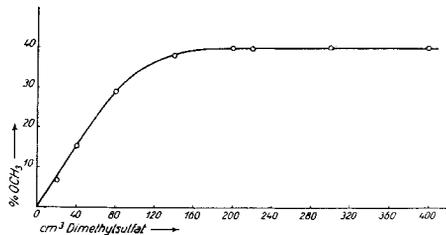


Fig. 4. Methylnahme durch Cellulosefasern (Dimethylsulfat-Natronlauge bei 60°) bei Verwendung der Vorrichtung entspr. Fig. 3 unter den angegebenen Bedingungen.

Tabelle 1.

Methylierung von Cellulosefasern (Baumwolle, Ramie) für die Endgruppen-Bestimmung.

Versuchs-Nr.	Ausbeute in % d. Th.	% OCH ₃ *)
1	95.5	40.8
2	95.0	39.9
3	95.5	42.9
4	94.0	42.5
5	92.0	40.4
6	94.0	42.3
7	94.0	40.7
8	93.0	42.4
9	94.0	41.5
10	93.0	42.8
11	96.0	42.0
12	98.0	41.7
13	96.3	42.3
14	97.6	42.6
15	97.6	41.8
16	98.5	42.8

*) Mit Ausnahme von Versuch-Nr. 1, 2 und 3 wurden die Methoxyl-Bestimmungen nach dem auf S. 734 wiedergegebenen Verfahren ausgeführt.

Die Versuche Nr. 1 bis 10 sind ohne Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt worden. Man erkennt deutlich, daß in diesem Falle die Ausbeuten niedriger liegen (2—3%).

Zur Durchführung einer Endgruppen-Bestimmung sind die Reaktionsprodukte von 5 bis 10 derartigen Methylierungsansätzen notwendig. Die Spaltung und Glucosidifizierung wurde genau nach der Vorschrift von Hess und Neumann⁸⁾ ausgeführt.

Trennung der Methyl-glucoside: Bei der Beschreibung der Trennung der Spaltzucker beschränken wir uns hier auf die künstlichen Mischungen und verweisen für die Anwendung der Methode auf Cellulose auf die in der folgenden Mitteilung wiedergegebenen Beispiele. Die Mischung Nr. 1, be-

⁸⁾ B. 68, 1365 [1935].

stehend aus 21.4513 g 2.3.6-Trimethyl-methyl-glucosid und 10.6 mg 2.3.4.6-Tetramethyl-methyl-glucosid wurde mit der 20-fachen Menge 5-proz. wäßriger Salzsäure 15 Stdn. bei 100° hydrolysiert⁹⁾. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Zucker-Sirup wurde, mit Äther überschichtet, der Krystallisation überlassen. Die nach etwa 2 Tgn. in harten Krusten auskrystallisierte 2.3.6-Trimethyl-glucose wurde unter der Mutterlauge zerrieben, abfiltriert, einmal mit kaltem Äther gewaschen und zur Herauslösung etwa eingeschlossener 2.3.4.6-Tetramethyl-glucose einmal in der früher beschriebenen Weise¹⁰⁾ im Soxhlet umkrystallisiert. Alle Mutterlaugen und Waschlösungen wurden vereinigt und hinterließen beim Eindampfen 5.1 g Sirup, der, in üblicher Weise glucosidifiziert, eine Ausbeute von 5.1 g ergab.

Zur Phosphorylierung wurden die Glucoside in 12.5 ccm trockenem Pyridin¹¹⁾ gelöst, auf —20° gekühlt und mit einer ebenso kalten Lösung von 3.97 g (1.2 Mol.) Phosphoroxchlorid¹²⁾ in 20 ccm Pyridin vermischt, 30 Min. in der Kältemischung und nachfolgend über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt (reichliche Abscheidung von Pyridin-Salz-Krystallen).

Zur Zerstörung von überschüssigem Phosphoroxchlorid wurde unter starker Kühlung mit 5 ccm einer Pyridin-Wasser-Mischung (4:1) versetzt. Nach 30 Min. wurde die Lösung mit 100 ccm Wasser verdünnt und mit 24.5 g fein gepulvertem Ätzbaryt (entsprechend der Gesamtmenge des verwendeten Phosphoroxchlorids) bis zur schwach alkalischen Reaktion (Phenolphthalein) geschüttelt. Vom ungelösten Bariumhydroxyd wurde abfiltriert, gewaschen, das Filtrat durch Einleiten von CO₂ neutralisiert, und die von den Bariumsalzen milchig getrübbte Lösung im Vak. eingedampft, wobei zur Verhinderung des Schäumens Xylol zugesetzt wurde.

Der trockne Rückstand wurde mit kaltem Aceton verrieben, wobei die anorganischen Bariumsalze ungelöst blieben. Auf Zusatz von 1 l Äther fiel die Hauptmenge des Bariumsalzes der 2.3.6-Trimethyl-methyl-glucosid-4-phosphorsäure als feines weißes Pulver aus. Das klare Filtrat von den Bariumsalzen wurde stark eingengt, mit 1 l Petroläther (Sdp. 30—50°) versetzt, wobei sich der Rest der organischen Bariumverbindung abschied. Der Rückstand der Petroläther-Lösung wurde in das in Fig. 1 abgebildete Destillierkölbchen übergeführt und in Benzol-Lösung 1 Stde. mit frisch geschnittenen Natrium-Späncchen unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdunsten des Benzols bei Atmosphärendruck wurde der Kolbenrückstand unverzüglich und ohne Entfernung des mit einem bräunlichen Beschlag bedeckten Natriums im Hochvak. (3×10^{-3} mm, 40—60° Badtemperatur) destilliert.

An der während der Destillation von Eiswasser durchströmten Kühlschleife sammelten sich 6.2 mg eines farblosen, leicht beweglichen Öles. Nach Reinigung des Kölbchens wurde das Destillat mit einigen Tropfen Benzol heruntergespült und nach Zusatz eines frischen Natrium-Späncchens die Operation wiederholt: 4.9 mg Destillat; gef. 62.2% OCH₃, ber. 62.0%¹³⁾.

Um festzustellen, wie groß der Substanz-Verlust bei einer Destillation über Natrium in dem benutzten Destillier-Kölbchen der Fig. 1 ist, wurden

⁹⁾ Bei kürzerer Zeitdauer ist die Hydrolyse unvollständig.

¹⁰⁾ K. Hess u. F. Neumann, l. c.

¹¹⁾ Mit Ätzkali getrocknet, destilliert und über P₂O₅ aufbewahrt.

¹²⁾ Frisch über Calciumcarbonat destilliert.

¹³⁾ Methoxylbestimmung nach Verfahren auf S. 734 ausgeführt.

16.2 mg reine Pentamethyl-glucose mehrmals der gleichen Behandlung unterworfen. Aus Tab. 2 geht hervor, daß der durchschnittliche Substanzverlust bei einer Destillation unter diesen Bedingungen etwa 1.1 mg beträgt.

Tabelle 2.

Ermittlung des Substanz-Verlustes bei der Destillation von reiner Pentamethyl-glucose über Natrium im Destillierkölbchen entsprechend Fig. 1.

	mg im Kolben	mg Verlust
Einwaage	16.2	
1. Destillation	15.0	1.2
2. Destillation	13.8	1.2
3. Destillation	12.9	0.9
4. Destillation	11.8	1.1

Da bei der künstlichen Mischung bei der zweiten Destillation nur 6.2—4.9 = 1.3 mg verlorengegangen waren, darf man annehmen, daß praktisch mindestens 6.2 mg von den 10.6 mg, die die Mischung ursprünglich enthielt, wiedergefunden worden sind.

Die in der gleichen Weise aufgeteilte Mischung Nr. 2 ergab von den eingeführten 32.4 mg Pentamethyl-glucose 28.7 mg zurück. Der Verlust bei der Aufarbeitung ist also praktisch unabhängig von der eingeführten Menge an Pentamethyl-glucose.

Bariumsalz der 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid-4-phosphorsäure: Aus dem Gemisch der bei den beschriebenen Versuchen erhaltenen organischen und anorganischen Barium-Verbindungen wurde die organische Komponente durch Ausziehen mit Aceton und Fällen mit Petroläther (gegebenenfalls Wiederholung der Operation) als weißes amorphes Pulver gewonnen, das sich durch fraktionierte Fällungsversuche nicht weiter aufteilen ließ.

20.778 mg Sbst.: 6.356 mg BaSO₄, 5.694 mg Mg₂P₂O₇. — 3.512 mg Sbst.: 6.02 ccm n_{D}^{20} -Na₂S₂O₃.

C₂₀H₄₀O₁₃P₂Ba (767.7)¹⁴). Ber. Ba 17.90, P 8.08, OCH₃ 32.30.

Gef. „ 18.01, „ 7.64, „ 29.55.

¹⁴) Verbindung bestehend aus 2 Mol. Tetramethyl-methyl-glucosid, 2 Mol. Phosphorsäure und 1 At. Barium. Das Präparat ist schwach chlorhaltig (0.4%); auf eine Reindarstellung haben wir vorläufig verzichtet.