

280. G. G. Schneider und U. Fritschi: Über die Veresterung der Pektinstoffe, IV. Mittel.: Konstitutionsermittlung an Pektin-ester.

[Aus d. Institut für Chem. Technik d. Techn. Hochschule Karlsruhe.]

(Eingegangen am 14. Juni 1937.)

Die Vielzahl der Pektinkomponenten, die Kompliziertheit des Aufbaus der einzelnen Bestandteile hat die Konstitutionsermittlung bei den Pektinstoffen außerordentlich erschwert, sodaß bis heute über diese größte Unklarheit herrscht. Eine Trennung der einzelnen Komponenten auf physikalischem Wege, etwa durch fraktioniertes Umfällen, ist nicht sicher zu erreichen, da die Löslichkeiten der Pektinstoffe, sowie der begleitenden Pentosane usw. sehr ähnlich sind. Zur Erleichterung der Trennung lag es daher nahe, die Pektinstoffe zu verestern. Als geeignetes Verfahren wurde von uns schon früher die Veresterung der OH-Gruppen mit Säuren in Analogie zu Cellulose zu Nitro-pektin bzw. Acetyl-pektin gefunden, deren allen bisherigen Vorstellungen über Pektinstoffe widersprechende Eigenschaften, wie Filmbildung, Fadenbildung usw., beschrieben wurden¹⁾. Es wurde schon erkannt, daß wir in der Veresterung der Pektinstoffe ein bequemes Mittel besitzen, aus der Vielzahl der noch zweifelhaften und unbestimmten Pektinkomponenten das wesentliche Pektin-Gerüst ohne zu großen Abbau als Ester zu gewinnen. Damit ist es leichter geworden, sowohl die Molekülgröße und Molekülform als auch die Konstitution des Pektin-Gerüsts zu klären, da diese Ester osmotischen, viscosimetrischen und röntgenographischen Messungen besser zugänglich sind.

Die Molekülgröße und Molekülform der Pektin-ester sind in der III. Mitteilung besprochen worden, als deren Endergebnis das Vorliegen von großen Fadenmolekülen²⁾ mit weit geringerer Streckung als bei der Cellulose angegeben werden kann.

In der vorliegenden Arbeit soll die Konstitution der Ester genauer betrachtet werden, da durch die Ermittlung der Molekülgrößen die Vorstellungen Ehrlichs, die in einer ringförmigen Tetragalakturonsäure gipfeln, widerlegt sind.

Der große Vorteil in der Konstitutionsbestimmung der veresterten Pektinstoffe gegenüber Untersuchungen an ursprünglicher Pektinsäure ist die Tatsache, daß sich die Pektin-ester, insbesondere das Nitro-pektin, besser reinigen lassen als die Pektin-säuren, nach denselben Methoden wie bei der Nitro-cellulose. Wiederholtes, fraktioniertes Umfällen der Ester läßt ein Nitro-pektin mit definierten Eigenschaften entstehen. Außerdem ist der kolloidale Charakter bei den Pektin-estern bei weitem nicht so stark wie bei den hydrophilen Pektin-säure-Gallerten.

Die Konstitution der Pektin-ester.

Wir haben bereits in der I. Mitteilung über die Pektin-ester gezeigt, daß man dasselbe Produkt erhält, wenn man einmal von isolierter Pektinsäure (Ehrlich), das andere Mal direkt von pektinhaltigem Material (getrocknete Rübenschnitzel) ausgeht. Bis auf die Molekülgröße, die von der Behandlungsart abhängig ist, waren die Produkte identisch. Damit war es wahrscheinlich, daß man bei der Veresterung der Pektinstoffe jeweils das

¹⁾ F. A. Henglein u. G. G. Schneider, B. **69**, 323 [1936].

²⁾ Schneider u. Fritschi, B. **69**, 2537 [1936].

Hauptgerüst der Ester gewonnen hatte. Es wurde weiter geschlossen, daß das Produkt im wesentlichen aus Ketten von Galakturonsäure besteht. Diese Annahme quantitativ zu belegen, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die Behandlung von Nitro-pektin mit 12-proz. Salzsäure führt zur Abspaltung von Salpetersäure, Methylalkohol und CO₂, wobei Furfurol hinterbleibt. Der oxydative Abbau des Nitro-pektins mit Salpetersäure (*d* 1.15—1.10) führt zu Schleimsäure, der hydrolytische Abbau mit verdünnten, nicht oxydierenden Säuren (1—2%) zu Galakturonsäure. Bis zu diesem Punkte gehen unsere Beobachtungen mit den Feststellungen Ehrlichs über Pektin parallel³⁾. Jedoch sind folgende Fragen für die Klärung der Konstitution der Pektin-ester noch zu beantworten: I) Sind in dem Nitro-pektin außer der Galakturonsäure auch die übrigen Bestandteile der Ehrlichschen Formel vorhanden, nämlich Methoxygruppen, Galaktose, Arabinose und Essigsäure? II) Wie und in welcher Form sind diese Stoffe gebunden?

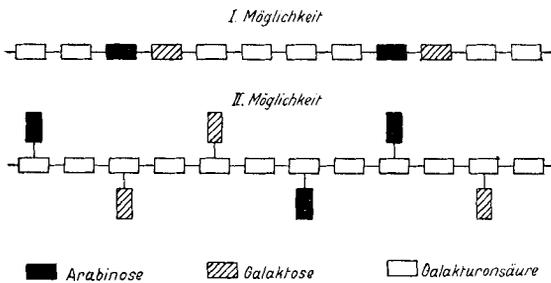
a) Methoxygruppen: Am leichtesten lassen sich die Methoxygruppen feststellen und isolieren. Im Nitro-pektin befinden sich 2—9% Methoxygruppen. Die Menge richtet sich nach den Ausgangsprodukten und der Behandlungsart.

Zur Ortsbestimmung der Methoxygruppen wurde Nitro-pektin in Analogie zu den Arbeiten von Haworth über Methyl-cellulose mit Salpetersäure (*d* 1.15) vorsichtig oxydiert. Es entstand Schleimsäure, aber keine Methyl-schleimsäure, die hätte entstehen müssen, wenn das Methoxyl als Äther an einer OH-Gruppe sitzen würde. Aus der leichten Abspaltbarkeit und aus der angeführten Meßreihe der Acidität in Abhängigkeit von dem CH₃-O-Gehalt des erhaltenen Nitro-pektins ergibt sich, daß das Methoxyl an der COOH-Gruppe sitzt, da mit sinkendem Methoxylgehalt die Acidität steigt (s. auch unten).

PH	4.0	3.8	3.7	3.5	3.5
CH ₃ O (N unverändert)	9.05	8.1	7.2	6.4	5.2

Daraus folgt bereits, daß Nitro-pektin als Hauptbestandteil Galakturonsäure besitzt, deren OH-Gruppen durch Salpetersäure und deren COOH-Gruppen durch Methylalkohol verestert sind.

b) Arabinose und Galaktose: Es bestehen 3 Möglichkeiten, wie die Stoffe Arabinose und Galaktose im Pektin-Molekül vorliegen: I) Arabinose



Abbild. 1.

und Galaktose sind hauptvalenzmäßig mit Galakturonsäure als Kettenglieder gebunden und können damit nicht ohne Zerstörung der Pektinkette entfernt werden. II) Arabinose und Galaktose sind hauptvalenzmäßig als Seitenkettenglieder an die Galakturonsäure-Ketten gebunden; sie können dem-

³⁾ Abderhalden, Handb. d. Biol. Arbeitsmethoden (Urban u. Schwarzenberg), Berlin 1936, Teil 11, II.

nach abgespalten werden ohne daß die Pektinkette aufgespalten wird. III) Arabinose und Galaktose sind Begleitstoffe der Galakturonsäure-Ketten. Wenn Arabinose und Galaktose als Kettenglieder in derjenigen Menge wie Ehrlich annimmt — 4 Galakturonsäuren je 1 Arabinose und 1 Galaktose —, vorhanden wären, so käme das auf jeden Fall in der Analyse zum Ausdruck, insbesondere durch die Bestimmung der Carboxylgruppe. Eine Abspaltung der Arabinosen und Galaktosen bei der Nitrierung würde jedoch zum Zerbrecen der Kette führen, was ohne weiteres aus der Molekülgröße zu ersehen ist.

Bei der Möglichkeit II kann man die Abspaltung von Arabinose und Galaktose bei der Veresterung nicht aus der Molekülgröße erkennen, da ja die Galakturonsäure-Kette intakt bleibt. Da aber bei der Veresterung zu Nitro-pektin der Methylalkohol als $\text{CO}_2 \cdot \text{CH}_3$ zum größten Teil erhalten bleibt, dürften Arabinose und Galaktose, falls sie in Äther-Bindung sitzen, noch viel weniger abgespalten werden, da Äther-Bindung fester ist als Ester-Bindung. Auf alle Fälle ist an eine vollständige Abspaltung dieser beiden Stoffe nicht zu denken.

Zu der Annahme III wurde durch Nitrierungsversuche mit isoliertem Araban festgestellt, daß dabei ein sehr starker Abbau der Molekülgröße dieses Stoffes erfolgt, sodaß es möglich ist, das Nitro-pektin nahezu vollständig durch Umfällen von solchen Begleitern zu befreien.

Zur Beantwortung dieser Frage wollen wir die genaue Untersuchung der Molekülgröße und die Analyse dieses Pektin-esters, insbesondere die Carboxylwerte in folgender Tabelle betrachten.

Nitro-pektin aus Pektinsäuren	η_{sp}/c	C	H	N	CH_3O	CO_2
	100	28.54	2.92	9.58	4.51	16.5
	110	28.42	2.95	9.81	4.72	16.1
	145	28.95	2.63	9.72	3.46	16.75
	180	30.71	3.11	8.05	4.26	17.90
	90	29.01	3.05	8.76	8.76	15.7
	85	31.91	3.14	8.24	9.72	17.40
Nitro-pektin aus Rüben direkt.						
	45	30.62	3.15	8.06	6.99	17.2
	50	31.73	3.13	7.85	6.33	18.0
	42	31.94	3.10	7.46	3.94	18.6
	55	29.58	2.87	8.34	4.75	17.10
Theoret. entsprechen einer: Vollmethylierten Polygalakturonsäure, Grundmol. 190..		44.2	5.26	—	16.3	23.15
Derselben mit einer NO_2 -Gruppe, Grundmol. 235.....		35.4	3.83	5.97	13.18	18.7
Mit 2 NO_2 -Gruppen, Grundmol. 280		30	2.86	10	11.05	15.7
Polygalakturonsäure: 2 NO_2 ohne CH_3O Grundmol. 268		27.05	2.25	10.52	—	16.53

Aus der Tabelle, insbesondere aus den CO_2 -Werten, geht hervor, daß wir es im allgemeinen mit einer anderthalbfach nitrierten Polygalakturonsäure mit ungefähr halbmethylierter COOH -Gruppe zu tun haben. Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß Arabinose und Galaktose keine wesentliche Bestandteile des Nitro-pektins und damit des Pektin-Gerüsts sein können.

Es ist aber noch die Frage zu beantworten, inwieweit Arabinose und Galaktose abgespalten werden konnten.

Die von uns untersuchten Produkte hatten ein Molekulargewicht von 50000—200000, sodaß also eine Abspaltung von Arabinosen und Galaktosen bei der Nitrierung, falls diese in der Menge, wie Ehrlich angibt, als Kettenglieder (nach Annahme I) vorliegen, völlig ausgeschlossen ist; denn sonst könnten nur noch kleine Bruchstücke von 4 Galakturonsäure-Einheiten vorliegen. Es bestände jedoch noch die Möglichkeit, daß die Polygalakturonsäure in großen Abständen, z. B. einmal auf 30 oder 40 Galakturonsäuren durch Einbau einer Arabinose oder Galaktose unterbrochen wäre, was sich selbstverständlich in der Analyse nicht so stark ausdrücken würde, weil bei solchen hochmolekularen Körpern in der Analyse stets etwas Toleranz geübt werden muß. Dann aber müßte diese Stelle im Molekül besonders schwach sein, und man würde bei systematischem Suchen öfters gleich große Bruchstücke antreffen. Dies konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Außerdem darf man diese Frage deshalb nicht überspitzen, weil bekanntlich ein genetischer Zusammenhang, insbesondere ein solcher zwischen Galakturonsäure und Arabinose, durch Decarboxylierung auf fermentativem oder hydrolytischem Wege besteht.

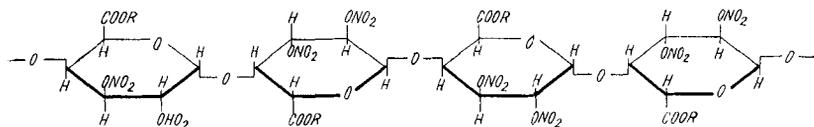
Falls Arabinose oder Galaktose nach Annahme II in Äther-Bindung vor der Nitrierung vorhanden sein sollte, dann ist nicht zu verstehen, warum die Methoxylgruppen bei vorsichtiger Nitrierung nahezu vollständig intakt bleiben, wo Äther-Bindung doch fester ist als Ester-Bindung.

Arabinose oder Galaktose in glykosidischer Bindung kann durch solche Analysen überhaupt nicht festgestellt werden, weil die Endgruppen bei derartigen Molekülgrößen nicht in Erscheinung treten. Weiter ist es undenkbar, daß die Arabinosen usw. etwa an der COOH -Gruppe verestert waren und abgespalten worden sind, da die COOH -Gruppe im Nitro-pektin zum größten Teil mit Methylalkohol verestert ist und der Rest der COOH -Gruppe in der Acidität der Pektinprodukte in Erscheinung tritt. Außerdem konnten die restlichen, im Ursprungspektin wahrscheinlich noch in geringerem Maße vorhandenen freien Carboxylgruppen gar nicht Arabinose und Galaktose in diesen Mengen, wie Ehrlich angibt, binden.

Aus diesen Messungen muß daher der Schluß gezogen werden, daß die großen Pektinketten im wesentlichen allein aus Galakturonsäure gebildet werden, ohne Zwischenschaltung von Arabinose und Galaktose. Da die Pektin-ester weitgehend frei von diesen Stoffen sind, so können diese nur sehr lose gebunden oder gar nur als Begleiter in den ursprünglichen Pektinstoffen vorhanden gewesen sein.

c) Essigsäure: Im Nitro-pektin konnten wir keine Acetylgruppen feststellen.

Demnach kommt dem Nitro-pektin die schon in unseren früheren Arbeiten vermutete Formel zu:

Abbild. 2. (R = CH₃ bzw. H)

Zur weiteren Sicherstellung dieser Vorstellung über den Aufbau der Pektin-ester wurde das Nitro-pektin mittels absol. Methylalkohols und trockener Salzsäure methyliert, wobei nur die COOH-Gruppen und die glykosidische Gruppe in Reaktion treten, nicht aber wirkliche Äther entstehen können.

Durch eine solche Methylierung der COOH-Gruppe und der glykosidischen OH-Gruppe, die sich nur am Kettenende befindet (Endgruppe), kann in zwei Richtungen ein Einblick in die Konstitution des Nitro-pekts erreicht werden: 1) Solange wir genügend große Ketten vor uns haben, bietet die maximale Veresterung der COOH-Gruppe ein Maß für die Carboxylgruppe und einen Beweis dafür, daß die Carboxylgruppe nicht zur Kettenverknüpfung dient und auch nicht durch Lactonbildung abgedeckt ist. 2) Bei genügend kleiner Kettenlänge muß sich zudem noch die Endgruppe im Ergebnis geltend machen, woraus wiederum auf die Kettenlänge (Molekulargewicht) geschlossen werden kann.

Die Methylierung mit Methylalkohol und Salzsäure ist je nach der Konzentration der Salzsäure mehr oder weniger von einem Abbau begleitet. Sie wurde deshalb einmal so vorgenommen, daß bei möglicher Erhaltung der Molekülgröße eine weitgehende Methylierung erreicht wurde; in zweiter Linie wurde eine völlige Methylierung bei paralleleghenden, starkem Abbau untersucht.

Methylierung unter Erhaltung der Molekülgröße: Reinstes Nitro-pektin von bestimmtem Molekulargewicht wurde am Rückflußkühler mit Methylalkohol und 2-proz. Salzsäure 2 Stdn. methyliert und dann mehr oder weniger lange unter Druck bei 100° behandelt.

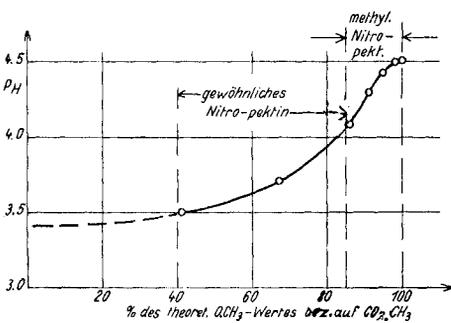
η_{sp}/c	pH	CO ₂	N	OCH ₃	% d. Th. bez. auf CO ₂ .CH ₃
40	4.2	17.3	8.06	11.2	91
40	4.3	17.7	7.44	11.8	95
35	4.3	18.6	6.22	12.55	96
40	4.25	17.4	7.9	11.4	92.5
38	4.25	17.6	7.58	11.8	95

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei voller Methylierung der CH₃-O-Gehalt der COOH-Gruppe nahezu entspricht. Eine vollständige Erreichung des theoretischen Methoxyl-Wertes (in bezug auf COOH) oder ein Überschreiten ist ohne Abbau der Ketten nicht zu erzielen. Ferner zeigt die Betrachtung der pH-Werte, daß bei nahezu völliger Methylierung der COOH-Gruppe beinahe ein Wert erreicht wird, wie ihn auch die Nitro-cellulose unter gleichen Bedingungen aufweist. Das Vorhandensein von COOH-Gruppen in Lactonbindung ist durch die pH-Werte unwahrscheinlich, außerdem zeigt das weitgehende Gleichbleiben der Kettenlänge (η_{sp}/c) im Zusammenhang mit der Veränderung der pH-Werte durch die Methylierung einwandfrei, daß die

COOH-Gruppe nicht an der Verknüpfung der Galakturonsäure-Ketten beteiligt ist.

Methylierung unter Abbau: Es wurde eben gezeigt, daß keine völlige Methylierung bei gleichbleibender Kettenlänge möglich ist. Darum wurde versucht, durch steigende Salzsäurekonzentration und lange Einwirkungsdauer eine höhere Methylierung ohne Rücksicht auf stärkeren Abbau zu erzwingen.

η_{sp}/c	PH	CO ₂	N	OCH ₃	% d. Th. bez. auf CO ₂ ·CH ₃
25	4.5	20.3	3.9	14.1	99
20	4.5	21.5	2.54	15.0	100
15	4.5	22.1	1.4	15.8	100.7



Abbild. 3.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß mit stärkeren Methylierungsbedingungen zwar das Methoxyl den Endwert (entsprechend der CO₂H-Gruppe) erreicht, der Stickstoffgehalt aber wegen der Verseifung der NO₂-Gruppe sinkt und die Kette weitgehend aufgespalten wird. Damit verliert das Nitro-pektin allmählich seine Löslichkeit in Aceton und nähert sich wieder in seinem Verhalten methylierter Polygalakturonsäure von geringer Molekülgröße. Diese konnte

abwärts bis $\eta_{sp}/c = 15$ noch einwandfrei verfolgt werden. Bei diesen Produkten wurde ein Methoxyl-Wert gemessen, der dem theoret. Wert, bezogen auf COOH, entspricht, d. h. ein Anteil einer glykosidischen Methylgruppe konnte nicht festgestellt werden. Daraus ergibt sich, daß die Molekülgröße von den Endgruppen aus berechnet mindestens größer als 20000 sein muß, da ein Mehrgehalt der glykosidischen Methoxylgruppe ungefähr bei einem Mol.-Gew. von 20000 wegen der Fehlergrenze der Methoxyl-Bestimmung nicht mehr festgestellt werden kann⁴⁾. In dem Bereich jedoch, in dem Endgruppenbestimmungen möglich sind, können Esterprodukte wie Nitro-pektin nicht mehr erfaßt werden, da mit der Spaltung der Kettenlänge eine Verseifung der O·NO₂-Gruppe einhergeht.

Mit der Feststellung, daß beim Nitro-pektin auch nach starkem Abbau keine Endgruppen feststellbar sind, ist ein weiterer Beweis für das Vorliegen großer Molekül-Ketten gefunden worden, was mit den osmotischen und viscosimetrischen Messungen im Einklang steht.

Die Untersuchung von wasserlöslichen Pektin-Abbauprodukten, die keine Ester mehr sind, fällt außerhalb des Rahmens der Arbeit, zumal die

⁴⁾ Ein bei verschiedenen Abbaugraden gleichbleibender Mehrgehalt an OCH₃, den wir gelegentlich fanden, wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da erst genauere Untersuchungen erfolgen müssen, ob und wie weit dadurch auf den Feinbau (Ketten-Verknüpfung) geschlossen werden kann.

Amerikaner L. Baur und K. Link⁵⁾ gerade diese eingehend untersucht und Endgruppenbestimmungen durchgeführt haben.

Acetylierte Nitro-pektine wurden nicht zur Konstitutionsermittlung herangezogen, weil hier noch zu den bisherigen Komponenten (NO_2 , CH_3O , CO_2) die Acetylgruppe kommt, und so die Auswertung der Ergebnisse zu kompliziert und ungenau wird.

Beschreibung der Versuche.

1) Vorbereitung des Nitro-pektins zur Analyse: Um ein zur Analyse genügend reines Produkt zu erhalten, wurde das Nitro-pektin mehrfach umgefällt, indem es jeweils in Aceton gelöst und mit dem 50-fachen Volumen dest. Wassers ausgefällt wurde. Nach mehrmaligem Digerieren mit dest. Wasser wurde der Stoff abgesaugt und leicht abgepreßt. Diese Operation wurde so oft vorgenommen, bis der Aschengehalt unter 0.05% betrug. Das Produkt wurde mit Alkohol und Äther behandelt und in der Fischer-Pistole über P_2O_5 bei 65°/0.1 mm bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zum Vergleich wurde außerdem jeweils eine Molekül-Fraktionierung durch Ausfällen in Aceton-Wasser-Gemischen verschiedener Konzentration ausgeführt.

2) Analysenmethoden: Methoxyl-Bestimmungen wurden im Apparat von Hans Meyer und Bamberger⁶⁾, ausgeführt. Carboxyl-Bestimmungen nach Tollens-Lefèvre⁷⁾, aber unter Zwischenschaltung eines Verbrennungsofens mit PbO_2 und MnO_2 sowie Kaliumchromat⁸⁾ zur Zerstörung der entstandenen Stickoxyde. Zur Parallelbestimmung wurde das entstandene CO_2 als BaCO_3 gefällt, BaCO_3 wurde als Sulfat gewogen. Das entstandene Puffulol wurde als Phloroglucid bestimmt⁹⁾.

Hrn. Prof. Dr. F. A. Henglein danken wir für die vielen Anregungen und für die fördernde Unterstützung unserer Arbeit.

281. G. G. Schneider und H. Bock: Über die Konstitution der Pektinstoffe.

[Aus d. Institut für Chem. Technik d. Techn. Hochschule Karlsruhe.]

(Eingegangen am 14. Juni 1937.)

Die Pektinstoffe bilden als stetige Begleiter der Cellulose einen wesentlichen Bestandteil der Zellwandungen im Nährgewebe der grünen Pflanzen. Im Gegensatz zum einheitlichen Aufbau der Cellulose ist die Konstitution der Pektinstoffe bis heute stets als äußerst kompliziert und verwirrend angegeben worden. Die Erforschung ihrer chemischen Zusammensetzung ist zwar Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen, insbesondere konnte Ehrlich durch systematische Bearbeitung der Pektinstoffe in den letzten Jahrzehnten als wichtigstes Spaltprodukt die *d*-Galakturonsäure isolieren, aber alle bisherigen Vorstellungen über den Gesamtbau der Pektinstoffe sind, wie in dieser Arbeit bewiesen wird, mit grundlegenden Eigenschaften der Pektinstoffe nicht in Einklang zu bringen.

⁵⁾ Morell, Baur u. Link, Journ. biol. Chem. **105**, 12 [1934].

⁶⁾ Hans Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organ. Verbindungen (1931), S. 487.

⁷⁾ Lefèvre, Dissertat. Göttingen (1907), S. 32; van der Haar, Monosaccharide und Aldehydsäuren (1920), S. 72.

⁸⁾ Orthner u. Reichel, Organ. Chem. Praktikum, Verlag Chemie.

⁹⁾ van der Haar, Monosaccharide und Aldehydsäuren, **6**, S. 482.