

# Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen an Zuckern und Inulin in flüssigem Ammoniak

Von

LEOPOLD SCHMID und LUDWIG HASCHEK

Aus dem II. Chemischen Universitäts-Laboratorium in Wien.

(Mit 1 Textfigur)

(Vorgelegt in der Sitzung am 3. Dezember 1931)

Die Vorstellungen über den Bau der Polysaccharide und auch anderer hochpolymerer Körper haben in den letzten Jahren unter dem Einfluß der Arbeiten einer Reihe von Forschern (H. STAUDINGER, M. BERGMANN, K. FREUDENBERG, K. H. MEYER, H. MARK, E. BERNER) zu der Auffassung geführt, daß es sich in diesen Substanzen um außerordentlich große Moleküle handelt. Einfluß auf die Weiterentwicklung des Gebietes nach dieser Richtung hin nahmen besonders die Arbeiten von STAUDINGER, der seine an Modellversuchen synthetischer Hochpolymerer gemachten Erfahrungen auf die natürlichen Hochpolymeren übertrug. Wenn diese Auffassung vom Bau der Zellulose, der Stärke, des Kautschuks und der Eiweißarten sicher sehr viel für sich hat und in den letzten Jahren auch die allgemeine Anerkennung zu finden scheint, so liegen in ihrer Verallgemeinerung insbesondere auf das Inulin Schwierigkeiten vor, welche durch die entwickelten Vorstellungen nicht erklärt werden können. Diese Schwierigkeiten sind bedingt durch die Arbeiten von SCHMID und BECKER<sup>1</sup>, ferner durch die von REIHLEN und NESTLE<sup>2</sup>, denen zufolge sich für das Inulin in flüssigem Ammoniak eine Teilchengröße von 320 ergab. Im Hinblick auf das umfangreiche experimentelle Material, das obengenannte Autoren im Sinne langer, kettenförmiger Moleküle oder von Mizellen auswerten, ist es naheliegend, Einwände gegen das unwahrscheinliche Ergebnis einer kleinen Teilchengröße zu machen. Denn je mehr der hochmolekulare Zustand bei den Polysacchariden betont wird, um so schroffer tritt der Gegensatz der niedrigen, am Inulin gefundenen Werte hervor.

Bevor wir aber im einzelnen auf die Einwendungen gegen die Auffassung kleiner Teilchen in Ammoniak zu sprechen kom-

<sup>1</sup> Ber. D. ch. G. 58, S. 1968.

<sup>2</sup> Ber. D. ch. G. 59, S. 1159.

men, wollten wir uns weiteres Versuchsmaterial verschaffen, um uns darauf stützen zu können.

Die Überprüfung schien uns auch aus folgenden Gründen von Wert:

1. Wurde das nicht nur seinerzeit verwendete Inulinpräparat, sondern auch ein anderes (bezogen von der Firma Th. SCHUCHARDT) in Untersuchung genommen.

2. Dehnten wir die Methode der Molekulargewichtsbestimmungen in flüssigem Ammoniak auch auf einfache Zucker aus, für deren Lösungszustand sicher kein höheres Molekulargewicht angenommen werden muß.

3. Erreichten wir durch verschiedene Verbesserungen an der Apparatur eine weitaus größere Empfindlichkeit.

4. Studierten wir den Versuch in Abhängigkeit von der Zeit.

In der Wahl der Apparatur hielten wir uns im wesentlichen an die in der ersten Arbeit gesammelten Erfahrungen. Eine größere Genauigkeit erzielten wir durch ein empfindlicheres Galvanometer mit der üblichen Fernrohrablesung. Ferner erwies sich die von uns diesmal verwendete elektrische Rührung deshalb als besonders praktisch, weil sie infolge ihrer Gleichmäßigkeit eine entsprechende Konstanz des Schmelzpunktes bedingte. Was die Versuche in der Abhängigkeit von der Zeit betrifft, so sei darauf hingewiesen, daß wir wiederholt durch stundenlanges Überprüfen des Gefrierpunktes keine oder nur eine unwesentliche Änderung desselben konstatieren konnten. (Längste Schmelzpunktskontrolle zehn Stunden.)

Von den Molekulargewichtsbestimmungen anderer Zucker in flüssigem Ammoniak interessierte uns zunächst besonders die Saccharose, weil diese die gleiche Depression ergeben sollte wie das Inulin, was sich durch den Versuch bestätigt hat. Weitere Messungen an einem Monosaccharid, wie Fruktose, und einem Trisaccharid, wie Raffinose, ergaben die theoretisch geforderten Molekulargewichte, ein Befund, der klar zeigt, daß diese Methode ohneweiters bei Kohlenhydraten angewendet werden darf. Weiters folgt daraus eine gewisse Sicherheit für die Annahme des Wertes  $13 \cdot 2$  als kryoskopische Molekulargewichtskonstante, die in der ersten Arbeit aus Messungen an Mannit und Azetanilid bestimmt worden war.

Die aus den Erniedrigungen ermittelbaren Werte zweier verschiedener in Untersuchung genommener Inulinpräparate ergaben eine durchschnittliche Teilchengröße von 320. Dazu ist zu

sagen, daß wir uns in einem Konzentrationsbereich von 0.09—0.3 *g* Einwaage bewegten, wobei die Menge des Lösungsmittels in den meisten Fällen zwischen 16 und 20 *g* gewählt wurde. Die durch Verdampfen des Ammoniaks zurückgewonnenen Präparate wurden auf ihre spezifische Drehung untersucht, die ausnahmslos mit den entsprechenden Drehwerten vor der Ammoniakbehandlung übereinstimmte. In wenigen Ausnahmefällen ließen wir das Lösungsmittel tagelang auf das betreffende Präparat einwirken und konnten ebenfalls keine Änderung des Drehwertes bemerken. Besonders beachtenswert scheint noch die Tatsache, daß das zurückgewonnene Inulin und ebenso auch die anderen nach den Bestimmungen zurückgewonnenen Zucker bei Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop (Mikrochemie, Band 9, Seite 430) keinen Unterschied gegenüber den nicht mit Ammoniak behandelten Produkten erkennen ließen.

Angesichts des zahlreichen Versuchsmaterials, das für lange Ketten in den Polysacchariden spricht, ist man gern geneigt, Einwände gegen diese am Inulin gefundene Teilchengröße zu machen. Wir können aber auf Grund dieser und anderer noch nicht veröffentlichter Versuche eine Verallgemeinerung der für Zellulose, Stärke und andere Produkte vorgeschlagenen Auffassungen nicht unwidersprochen lassen, soweit sie auf das Inulin ausgedehnt werden. Es sei daher im einzelnen Stellung genommen. Zunächst könnte man sagen, daß die Depression zustande kommt infolge Bildung von Solvaten in dem Sinne, daß die Lösung an freiem Lösungsmittel durch Bindung an das Kohlenhydrat so verarmt, daß niedrige Werte vorgetäuscht werden. Diesem Einwand konnte leicht begegnet werden durch Viskositätsmessungen an Inulinlösungen in Ammoniak, worüber in einer eigenen Arbeit berichtet werden soll. Dabei zeigte es sich, daß Inulinlösungen ein identisches Verhalten zeigen mit Lösungen von einfachen Disacchariden.

Man könnte ferner einwenden, die Teilchenzahl sei in der Lösung vermehrt worden durch Bildung elektrolytisch dissoziationsfähiger Stoffe, wodurch ebenfalls eine starke Gefrierpunktniedrigung zu erwarten wäre. Doch bewiesen Leitfähigkeitsmessungen, die L. SCHMID und ZACHERL ausführten, daß Inulin- und Glykogenlösungen innerhalb der Fehlergrenzen die gleiche Leitfähigkeit besitzen wie das Lösungsmittel Ammoniak.

Der von E. BERNER (Ber. D. ch. G. 63, S. 1356) erhobene Einwand, die niedrigen Werte bei Molekulargewichtsbestimmungen am

Inulin könnten durch Alkoholgehalt vorgetäuscht werden, scheint uns aus folgendem nicht stichhaltig. Wir möchten darauf hinweisen, daß BERNER, wenn er die Arbeit von SCHMID und BILOWITZKY<sup>3</sup> gelesen hat, sehen mußte, daß das verwendete Inulin nicht wasser- oder alkoholhaltig sein konnte, sonst hätte es ja auch bei Molekulargewichtsbestimmungen in Phenol und Pyridin eine Depression geben müssen, wovon aber nicht die geringste Spur zu merken war.

In diesem Zusammenhang müssen wir auch gegen die Art und Weise Stellung nehmen, wie sich MEYER und MARK in ihrem Werke „Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe“, Seite 216, zu unserem Befund am Inulin äußern. Sie schreiben dort:

„Nach DREW und HAWORTH sowie BERNER beträgt die Teilchengröße des Inulins in Wasser 3500. Gegen die Zuverlässigkeit zahlreicher Angaben über kleinere Teilchengrößen in Wasser, Ammoniak usw. sind kürzlich von Berner so berechtigte Bedenken vorgebracht worden, daß sie nicht als diskussionsreif gelten können.“

Wir betonen noch einmal, daß wir die auf so verschiedene Weise begründete Annahme großer Moleküle für die Zellulose und Stärke, sei es, daß man sie als Mizelle oder Ketten- bzw. Fadennoleküle auffaßt, durchaus nicht bezweifeln wollen. Wenig beweisbar aber erscheint uns gerade angesichts unserer Versuche die Übertragung dieser Zelluloseüberlegungen auf das Reservekohlenhydrat Inulin. Schließlich ist ja unser Zahlenmaterial aus Experimenten abgeleitet, die sich auf das sicher fundierte RAOULTSCHE Gesetz aufbauen, während die Vorstellungen von MEYER und MARK, soweit man sie auf Inulin überträgt, hauptsächlich auf Analogieschlüssen der an Zellulose, Stärke und anderen Hochpolymeren gesammelten Erfahrungen beruhen, die sie, ohne experimentelles Material zu erbringen, auf das Inulin übertragen. Es erscheint uns daher unbegründet, ein experimentelles Ergebnis als „nicht diskussionsreif“ hinstellen zu wollen. Wir glauben, von einer neu aufgestellten Theorie verlangen zu können, daß sie sich vielmehr mit allen vorliegenden Tatsachenmaterialien auseinandersetzt. Man kann daher mit einer gewissen Berechtigung auf die Schwierigkeiten hinweisen, die sich angesichts unserer Versuche ergeben, wenn man sie vom Standpunkt der Mizelltheorie erklären soll.

Schließlich möchten wir noch bemerken, daß in dem Biochemischen Handlexikon, Band 13 (Ergänzungsband), in dem von

<sup>3</sup> Monatsh. Chem. 47, 1926, S. 743. bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 135, 1926, S. 743.

ZEMPLEN bearbeiteten Abschnitt über „Stärke, Dextrine, Kohlenhydrate der Inulingruppe, Zellulose usw.“ auf Seite 101 erwähnt wird, daß die erste Bestimmung der Teilchengröße des Inulins in flüssigem Ammoniak von REIHLEN und NESTLE stammt. Demgegenüber möchten wir hinweisen, daß die erste Arbeit von SCHMID und BECKER am 8. Juli 1925 (Ber. D. ch. G. 58, S. 1968) erschienen ist, während die Arbeit von REIHLEN und NESTLE am 9. April 1926 (Ber. D. ch. G. 59, S. 1159) publiziert wurde, da ja auf Grund unserer Veröffentlichung REIHLEN und NESTLE erst an dem von uns verwendeten Präparat ihre Versuche vorgenommen haben.

### Beschreibung der Versuche.

Bei der Aufstellung der Apparatur hielten wir uns im wesentlichen an die Arbeit von SCHMID und BECKER: Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen in flüssigem Ammoniak (Ber. D. ch. G. 58, S. 1968). Wir verwendeten wieder ein Platinwiderstandsthermometer, das beim Schmelzpunkt des Ammoniaks einen Widerstand von 17·3 Ohm besaß. Es wurde nach BECKMANN (Z. a. Chem. 67, S. 22) in eine WHEATSTONEsche Brücke geschaltet, deren Stöpselrheostaten im Verhältnis 1 : 10 standen. Die Temperaturdifferenzen wurden wie üblich mittels Fernrohres durch die Ausschläge eines Spiegelgalvanometers an einer Skala gemessen.

Die Empfindlichkeit der Apparatur wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t = 1/0\cdot00572 \cdot r \cdot a.$$

*t*: Anzahl der Grade bei Änderung der Galvanometerskala um 1 mm.

*r*: Gesamtwiderstand von  $V_2 = 500\cdot3$  Ohm.

*a*: Ausschlag in mm bei Änderung von  $V_2$  um 1 Ohm = 460 mm.

0·00572: Temperaturkoeffizient des Platinwiderstandsthermometers bei  $-75^\circ$ .

Es entspricht daher ein Ausschlag über einen Millimeter auf der Skala gleich  $0\cdot0007596^\circ$ .

Als Konstante des Lösungsmittels wurde der Wert von  $K = 13\cdot18$  in Rechnung gezogen.

Das Gefriergefäß hatte einen erweiterten Hals. Zum Verschuß diente ein vierfach durchbohrter Gummistopfen, und zwar je eine Bohrung für die Zu- und Ableitung des Ammoniakgases, eine für das Thermometer und die vierte für den Rührer. Zur Rührung verwendeten wir einen Glasrührer, der in dem Glasrohr *g*,

welches im Stopfen festsetzt, leicht auf und ab bewegt werden kann. Dieses Rohr trug oben bei *s* noch einen kleinen Gummistopfen, um den mittels Drahtes ein fester Gummifingerling angezogen war, durch dessen Spitze — wie aus der Figur ersichtlich — der Rührer durchgeführt wurde. Bei *o* wurde noch eine kleine Drahtligatur angebracht. Diese Vorrichtung erwies sich bei wiederholtem Überprüfen als absolut verlässlich dicht. Der Glasrührer wurde mit einem elektrischen Rührwerk verbunden, denn es zeigte sich, daß durch eine gleichmäßige und ziemlich rasche Rührung, wie sie nur durch einen elektrischen Antrieb erzielt werden kann, auch eine lange anhaltende Konstanz des Gefrierpunktes beobachtet werden konnte.

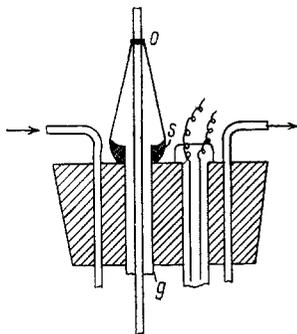


Fig. 1.

Das Ammoniak wurde so wie in der ersten Arbeit sorgfältigst getrocknet, in einer mit Natrium beschickten Eprouvette mittels Kohlensäure-Azeton-Kältemischung kondensiert und nach etwa zweistündigem Stehenlassen über Natrium in das Gefriergefäß destilliert, worauf die Bestimmungen ausgeführt wurden. Wir überzeugten uns auch durch Leerversuche, daß während einer zehnstündigen Kontrolle eine Änderung des Gefrierpunktes nicht zu bemerken war.

Gegen den Luftzutritt von außen wurde das flüssige Ammoniak dadurch geschützt, daß wir an das Ableitungsrohr noch drei dem Trockensystem für die Zuleitung analog beschickte Trockentürme anschlossen und schließlich die Ableitung in einen Abzug führten. Daraus folgt, daß die Apparatur völlig gegen Kohlensäure- und Wasserzutritt geschützt war. Wir überzeugten uns auch, daß Offenhalten bis zu 10 Sekunden keine Änderung des Schmelzpunktes bedingte.

Nach Ausführung der Gefrierpunktsbestimmungen an den Lösungen des Inulins und der anderen Kohlenhydrate ließen wir durch Entfernung der Kältemischung das Ammoniak abdunsten und befreiten das zurückgewonnene Präparat im Vakuum von den letzten Spuren des Ammoniaks. Anschließend Bestimmungen der spezifischen Drehung ergaben analoge Werte wie vor dem Lösungsvorgang.

Das von der Firma Th. SCHUCHARDT bezogene Inulin wurde tagelang bei 75—80° im Hochvakuum getrocknet und ergab dann folgende Werte:

Einwaage	Lösungsmenge	Ausschlag am Galv.	Mol.-Gew.
0·0993 <i>g</i>	20·40 <i>g</i>	27	313
0·1324 <i>g</i>	20·40 <i>g</i>	41	275
0·3401 <i>g</i>	20·40 <i>g</i>	89	327
0·2075 <i>g</i>	20·40 <i>g</i>	53	333
0·0872 <i>g</i>	18·63 <i>g</i>	26	312

Ein zweites Inulinpräparat war identisch mit dem in der ersten Arbeit verwendeten.

Einwaage	Lösungsmenge	Ausschlag am Galv.	Mol.-Gew.
0·2035 <i>g</i>	20·25 <i>g</i>	48	363
0·2729 <i>g</i>	20·25 <i>g</i>	73	320

Lävulose (Merck):

Einwaage	Lösungsmenge	Ausschlag am Galv.	Mol.-Gew.
0·2103 <i>g</i>	17·98 <i>g</i>	101	201
0·2260 <i>g</i>	19·45 <i>g</i>	133	152
0·1637 <i>g</i>	19·45 <i>g</i>	74	197
0·3812 <i>g</i>	19·45 <i>g</i>	180	189
0·5449 <i>g</i>	19·45 <i>g</i>	254	191

Saccharose (Kahlbaum):

Einwaage	Lösungsmenge	Ausschlag am Galv.	Mol.-Gew.
0·0595 <i>g</i>	15·38 <i>g</i>	18	373
0·1495 <i>g</i>	16·15 <i>g</i>	48	335

Raffinose (Kahlbaum), getrocknet im Hochvakuum, wo es 17·86% Wasser abgab:

Einwaage	Lösungsmenge	Ausschlag am Galv.	Mol.-Gew.
0·0828 <i>g</i>	19·2 <i>g</i>	14	535
0·2370 <i>g</i>	20·4 <i>g</i>	41	533
0·4976 <i>g</i>	20·4 <i>g</i>	86	492
0·5434 <i>g</i>	20·4 <i>g</i>	95	488

---