

Die Methodik der Konstitutionsermittlung hochmolekularer Naturstoffe¹

Von

K. FREUDENBERG

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 31. 7. 1936. Vorgelegt in der Sitzung am 15. 10. 1936)

1. Tannin.

Anknüpfend an Gedanken, die EMIL FISCHER in seinem denkwürdigen Vortrage vor den deutschen Naturforschern und Ärzten 1913 in Wien entwickelt hat, äußerte er sich 6 Jahre später in seinem Todesjahr²:

„Solche Substanzen wie das Tannin gibt es ... eine recht große Anzahl. Ich erinnere hier nur an die Proteine und die komplizierten Kohlenhydrate. Ihnen steht die Forschung anders gegenüber als den einfachen Substanzen ...

Meine Meinung geht dahin, daß es selbstverständlich die letzte Aufgabe des Chemikers ist, alle komplizierten Gemische organischer Substanzen, welche die Natur uns darbietet, in die einzelnen Bestandteile zu zerlegen und deren Struktur durch Analyse und Synthese aufzuklären. Wo aber diese Aufgabe vorläufig nicht zu lösen ist, da braucht der Forscher keineswegs resigniert die Hände in den Schoß zu legen. Denn er kann auf einen Teilerfolg hinarbeiten, indem er solche Stoffe nicht als Einzelindividuen, sondern als Gruppe verwandter Körper behandelt und ihnen womöglich durch Synthese ähnlicher Substanzen zu Leibe geht.

Je enger die Gruppe umgrenzt werden kann, um so größer wird der Teilerfolg sein. Wie weit man auf solche Weise kommen kann, hoffe ich an dem Tannin gezeigt zu haben.“

¹ Nach Vorträgen, die im November 1935 vor den Ortsgruppen des Vereins Deutscher Chemiker in Innsbruck, Graz und Wien gehalten wurden. Aus einem Wunsche der Einladenden erklärt sich, daß die angeführten Beispiele den eigenen Arbeitsgebieten entnommen sind, also keine Vollständigkeit beanspruchen. Literatur: K. FREUDENBERG, Tannin, Cellulose, Lignin, Berlin 1933, sowie die anschließenden Arbeiten in den Berichten und Annalen der Chemie; für Insulin: letzte Jahrgänge der Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. Für Cellulose (1935) und Stärke (1936) vgl. Übersichten in der Chem.-Ztg.

² Ber. dtsch. chem. Ges. 52 (1919) 809.

Die Galläpfeltannine sind amorph, besitzen Molekulargewichte bis zu 1700 (chinesisches Tannin in Bernsteinsäuredimethylester) und bestehen aus esterartig gebundener Gallussäure und Zucker. Im chinesischen Tannin sind etwa 9 (P. KARRER) Gallussäureeinheiten mit Glucose verbunden, und zwar derart, daß zunächst 5 Moleküle Gallussäure mit den 5 Hydroxylen der Glucose verestert sind und die meisten dieser Gallussäurereste wiederum an ihrem *m*-Hydroxyl weitere Gallussäure in Esterbindung (Depsidbindung) tragen. Das Naturprodukt ist zweifellos ein Gemisch aus Molekülen mit 8, 9, 10 Gallussäureeinheiten, deren Verteilung in den geschilderten Grenzen variiert. Auch für die Zuckerkomponente ist der Spielraum groß: sie kann in α - oder β -Form als Furanose oder Pyranose vorliegen.

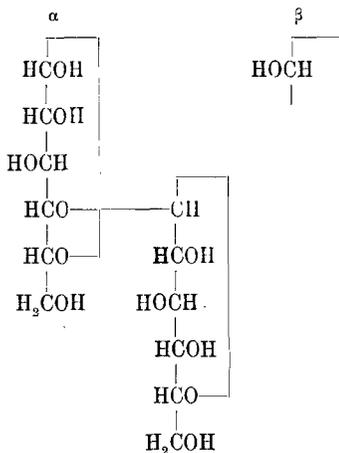
Gegenüber diesem Substanzgemisch mußte sich die Konstitutionsforschung den von E. FISCHER geschilderten Verzicht auferlegen; der Fortschritt aber, den E. FISCHER deutlich geahnt hat, bestand darin, daß die Forschung lernte, in Typen zu denken, indem es darauf ankommt, das *Bauprinzip* des Naturstoffs zu ermitteln. Elementarzusammensetzung, Molekulargewicht, quantitatives Verhältnis der Bausteine zueinander erhalten die Bedeutung von Durchschnittswerten; die Synthese kann nicht auf das von der Natur gebotene, untrennbare Gemisch, sondern nur auf eine idealisierte Einzelfraktion, in diesem Falle die Penta-digalloyl- α -glucopyranose hinstreben.

Diese Begriffsbildung mag uns heute selbstverständlich vorkommen; damals ist sie neu und für die weitere Erforschung der hochmolekularen Naturstoffe richtunggebend gewesen. Denn hier entwickelte sich eine Konstitutionsforschung, die auf ihre elementaren Grundlagen verzichten mußte: das definierte Molekulargewicht und die stöchiometrischen Verhältnisse der Elemente und Molekülgruppen.

2. Cellulose.

Während am Tanningemisch die Molekulargewichtsbestimmung wenigstens einen Durchschnittswert und die Größenordnung anzeigt, fehlt an der Cellulose dieses Hilfsmittel völlig. Nur daß das Molekulargewicht groß sei, d. h. viele Glucoseeinheiten umfasse, war der kritischen Konstitutionsforschung jederzeit bewußt. Im übrigen stand sie einer eigenartigen Eintönigkeit des Gebildes gegenüber, das nur aus Glucose besteht und wenige Angriffspunkte bietet. Die merkwürdigsten Hypothesen

tauchten auf, die wir hier beiseite lassen. In Wirklichkeit war man nicht über die Cellobiose, das vorletzte Spaltstück des Abbaus, hinausgekommen.



An ihr konnten die am Tannin entwickelten Gedankengänge, die Frage nach dem Bindungsprinzip, ansetzen. In diesem Disaccharid liegt eine bestimmte Bindungsart von Glucose zu Glucose vor, die Cellobiosebindung. Die Ausbeute an Cellobiose übersteigt nicht 45 % (nach dem Ansatz $2 \text{ C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O} = \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$); damit sind nur 20 % aller Bindungen als Cellobiosebindungen gekennzeichnet. Welcher Art sind die übrigen Bindungen; sind sie alle Cellobiosebindungen oder kommen noch andere Bindungsarten vor? Vor dieser Frage versagte die bisherige Methodik der Strukturchemie. Dies änderte sich auch nicht durch die Strukturaufklärung der Cellobiose (W. N. HAWORTH) und die Auffindung kristallisierter Cellotriase und Tetraose unter den Abbauprodukten der Cellulose (R. WILLSTÄTTER, L. ZECHMEISTER). Denn für diese Oligosaccharide erhob sich die gleiche Frage.

Sie konnte durch die Untersuchung der Reaktionskinetik gelöst werden. Die einfachste Annahme, die geprüft werden konnte, ist die, daß jede Glucoseeinheit der Cellulose mit der nächsten durch die Cellobiosebindung verknüpft ist, daß also einheitliche Ketten vorliegen. Der Rechnung wurde (von 1921 ab) die Zahl von 100 Kettengliedern zugrunde gelegt. Wenn alle 99 Bindungen mit gleicher Geschwindigkeit gespalten werden, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß z. B. die 3. und die 41. Bindung gelöst wird, gleich groß. Wenn innerhalb eines jeden

der entstehenden Bruchstücke die Geschwindigkeit (die in jedem Bruchstück eine andere sein darf) wiederum gleich groß ist, so können im homogenen System an einem bestimmten Zeitpunkt maximal 33 % Biose vorhanden sein, und es durchlaufen während des gesamten Reaktionsverlaufes 67 % aller Zuckereinheiten die Stufe der Cellobiose. Der Versuch hat ergeben, daß außer den erwähnten 45 % Cellobiose ungefähr weitere 15—20 % während der Reaktion entstehen und verloren gehen, so daß die Zahl von 67 % nahezu erreicht und bestimmt nicht wesentlich überschritten wird — eine ausgezeichnete Bestätigung für die Annahme einheitlicher Cellobioseketten.

Die weitere Untersuchung hat ergeben, daß von den möglichen Vorstellungen über die Kinetik des Abbaus einheitlicher Ketten, von denen die oben geschilderte eine ist, die folgende eine bessere Annäherung an die Wirklichkeit bedeutet.

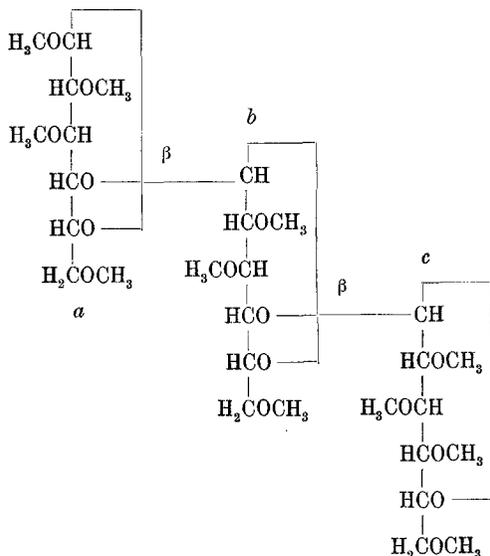
Die Spaltungsgeschwindigkeit k_2 der Cellobiose ist verschieden von der Anfangsgeschwindigkeit k_n , mit der die Cellulose gespalten wird. Und zwar ist k_n je nach den gewählten Bedingungen (Hydrolyse in wäßriger Schwefelsäure oder Acetolyse, d. h. Aufspaltung in der Mischung von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure) größer oder kleiner als k_2 . Die Anfangsgeschwindigkeiten für Triose und Tetraose (k_3 und k_4) liegen zwischen k_2 und k_n . Die Anfangsgeschwindigkeiten dieser Oligosaccharide stimmen in erster Annäherung mit der Vorstellung überein, daß eine Randbindung nach k_2 , alle übrigen Bindungen nach k_n gespalten werden ($k_3 = \frac{k_2 + k_n}{2}$; $k_4 = \frac{k_2 + 2k_n}{3}$; $k_m = \frac{k_2 + (m-2)k_n}{m-1}$, wobei m die Gliederzahl eines beliebigen Spaltstücks bedeutet). Benutzt man die bei der Acetolyse herrschenden Werte für k_2 und k_n , so kann man nach Formeln, deren sinnreiche Aufstellung W. KUHN verdankt wird, die maximale Ausbeute an Cellobiose berechnen. Sie beträgt nahezu denselben Wert wie bei der ersten Näherungsrechnung, nämlich 70 %, und steht damit gleichfalls im Einklang mit dem Versuch.

Von allen Hilfsannahmen, die rechnerisch durchgeführt sind, gibt die zuletzt entwickelte die besten Ergebnisse bei der Nachrechnung der Kinetik des Hydrolysenverlaufes. In starker Schwefelsäure (ca. 50 %) wird Cellulose zu Glucose hydrolysiert. Den Fortgang der Reaktion kann man an der Zunahme der mit Jod titrierbaren Aldehydgruppen sehr genau verfolgen. Die beobachtete Kurve des mit der Zeit beschleunigten Spaltungsvor-

ganges stimmt mit der aus k_2 und k_n berechneten vorzüglich überein. Die Formeln hat gleichfalls W. KUHN entwickelt. Auch die Oligosaccharide der Cellulose fügen sich ein. Das Ergebnis bedeutet einen zwingenden Beweis für die Richtigkeit der zugrundegelegten Vorstellung, nämlich das Vorhandensein einheitlicher, nur mit Cellobiosebindungen zusammengefügteter Ketten.

Nach der Auffindung der Cellotriose und Tetraose konnte dem Problem der Cellulose eine andere Formulierung gegeben werden: ist das Polysaccharid die Fortsetzung, gleichsam die Extrapolation der Reihe der Oligosaccharide? Oder stehen, was dasselbe bedeutet, Triose und Tetraose mit ihren Eigenschaften an der Stelle, die ihnen zwischen Biase und dem als ihre Extrapolation gedachten Polysaccharid zukommt?

Diese Frage ist, wie aus dem obigen entnommen werden kann, bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeiten bereits im bejahenden Sinne beantwortet. Am besten kann sie jedoch mit Hilfe des optischen Drehungsvermögens geprüft werden.



Methylierte Cellotriose (Dekamethyl- β -methyl-cellotriosid).

Zunächst muß die 1930 aufgefundene kristalline methylierte Cellotriose besprochen werden. Sie entsteht neben dem zugehörigen Biase- und Tetraosederivat bei der Methylierung von Abbauprodukten der Cellulose. Ihre Konstitution und Konfiguration konnte durch Abbau und Synthese völlig geklärt werden. Insbesondere ließ

sich durch die Synthese beweisen, daß beide Saccharidbindungen die hier bezeichnete β -Konfiguration, also Cellobioseanordnung besitzen. Die zugehörige Tetraoseverbindung, die gleichfalls kristallisiert, unterscheidet sich von dem Triosederivat dadurch, daß zwischen den Gliedern a und b , oder was dasselbe bedeutet, zwischen b und c ein weiteres Glied b eingeschoben ist. In der Octamethylcellobiose fehlt b ; wenn die Methylcellulose eine Extrapolation dieser Reihe ist, besteht sie fast ganz aus Gliedern b , neben denen die beiden Endgruppen a und c zu vernachlässigen sind.

Nun hat sich zuerst an diesen Methylderivaten erwiesen, das die molekulare Drehung der Triose von der Drehung der Biose um einen gewissen Betrag unterschieden ist, der gleich ist dem molekularen Drehungsunterschied von Tetraose und Triose und obendrein gleich ist der molekularen Drehung der Glucoseinheit im Polysaccharid. Diese Beziehung ist sofort verständlich, wenn die Glieder a , b , c ihre voneinander unabhängigen Drehungsbeiträge besitzen, die erhalten bleiben, wenn die Zahl der Glieder b variiert. Hier ist also der seltene Fall der Gültigkeit der optischen Superposition gegeben. Man hat inzwischen ermittelt, daß die Superposition dem Entfernungssatz der optischen Drehung unterworfen ist: sie gilt, wenn chemische oder sterische Änderungen in genügender Entfernung von einem ins Auge gefaßten Asymmetriezentrum vorgenommen werden. Tatsächlich ist diese Bedingung hier erfüllt und optische Superposition zu erwarten.

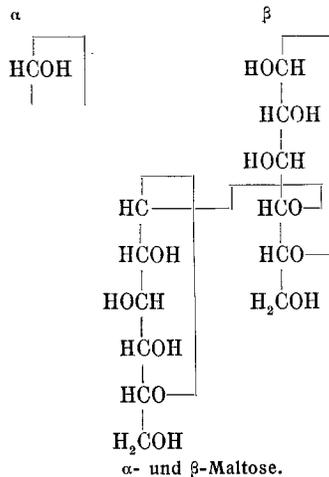
Die Gültigkeit dieser Beziehung ist an den freien Sacchariden, ihren Acetaten und Methyläthern in verschiedenen Lösungsmitteln mit großer Schärfe erfüllt. Hierin ist wohl der klarste Beweis für die geschilderte Formel der Cellulose zu erblicken. Die Schärfe dieser Beweisführung ist ausreichend, um die Behauptung zu erlauben, daß unter 50—100 Cellobiosebindungen der Cellulose keine Maltosebindung, die allein in Betracht kommen könnte, vorhanden ist.

Damit ist das Bauprinzip der Cellulose festgelegt. Unabhängig hiervon ist die Frage nach der Kettenlänge. Die chemischen Beweise haben bisher für etwa 200 Glieder gesprochen, nämlich das Reduktionsvermögen der endständigen Aldehydgruppe und die Menge der aus dem Endglied c der Methylcellulose entstehenden Tetramethylglucose (W. N. HAWORTH). Aber dieser Beweis ist neuerdings von K. HESS in Zweifel gezogen

worden zugunsten weit höherer Gliederzahlen. Aus der Viscosität schließt H. STAUDINGER auf eine Gliederzahl von der Größenordnung 1000.

3. Stärke.

Die beiden Anteile der Kartoffelstärke, Amylose und Amylopektin (M. SAMEC) verhalten sich wie bei der Methylierung (HAWORTH, HIRST), so auch in kinetischer Hinsicht völlig gleich. Sie folgen nebst ihrem Disaccharid, der Maltose, denselben Gesetzen wie die Cellulose, natürlich mit anderen Konstanten. Ausbeute an Disaccharid, zeitlicher Ablauf der Spaltung und vor allem auch hier das polarisationsoptische Verhalten (das auch an einer von WALDSCHMIDT-LEITZ aufgefundenen kristallinen Hexaose geprüft werden konnte) lassen auf Ketten schließen, in denen eine Maltosebindung der anderen folgt.



Die Grundlagen der Stärkechemie sind daher durch die an der Cellulose entwickelten Methode gesichert. Der Ausschluß anderer Bindungen kann jedoch nicht soweit getrieben werden, wie bei der Cellulose. Es kann gesagt werden, daß auf 30—50 Maltosebindungen keine andere Bindung vorkommen kann.

Die Tatsache, daß Amylasen aus Stärke bis zu 100% Maltose bilden, kann nur damit erklärt werden, daß vom Ende der Kette her Maltose um Maltose abgespalten wird. Auch bei vorgeschrittener Reaktion sind daher in der Mischung noch große Spaltstücke vorhanden, wodurch erklärt werden kann, daß die Jodreaktion erst zum Schluß verschwindet.

Methylierte Stärke liefert nach HAWORTH weit mehr Tetramethylglucose als Cellulose. Auf offene kürzere Ketten zu schließen ist jedoch unstatthaft, weil in den meisten Stärkefraktionen freie Aldehydgruppen fehlen. Daher sind, zum Teil unter Zuhilfenahme der organisch gebundenen Phosphorsäure, Verzweigungen der Ketten angenommen worden (MEYER und MARK, WALDSCHMIDT-LEITZ, STAUDINGER). Hierdurch würde zugleich das zweifellos große Molekulargewicht der meisten Stärkefraktionen erklärt. Auch große Ringe sind erwogen worden.

Es ist möglich, daß den kristallinen jodfärbenden Abbauprodukten, deren Entdeckung wir F. SCHARDINGER verdanken, für die Stärkechemie große Bedeutung zukommt. Denn es ist durchaus erwägenswert, daß diese durch *Bacillus macerans* gebildeten, nicht reduzierenden Dextrine keine Umwandlungs-, sondern richtige Abbauprodukte der Stärke sind und am Abschluß der Ketten teilnehmen. Ihre Untersuchung nach dem kinetischen und optischen Verfahren hat bisher ergeben, daß das Wichtigste dieser Dextrine vielleicht ein ringförmiges Pentaoseanhydrid mit 4 Maltosebindungen und einer β -Bindung ist, die jedoch keine Cellobiosebindung sein kann.

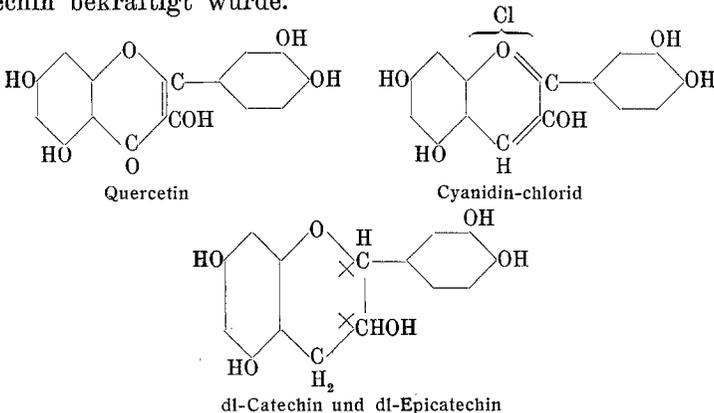
Vom Tannin unterscheiden sich Cellulose und Stärke dadurch, daß das Molekulargewicht wegen seiner Größe für die konstitutionschemische Beweisführung wesenlos wird. Man ist hier auf die Erforschung des Bindungsprinzips innerhalb des Moleküls und ohne Rücksicht auf seine Grenzen angewiesen. Dies wird bei der Cellulose durch die Schlichtheit der Konstitution erleichtert. Die Stärke hat mit ihr gemeinsam die Einheitlichkeit des Bausteins, der Glucose, wenn man von der geringen Menge akzessorischer Phosphorsäure absieht (bis 0·2% in einzelnen Fraktionen). Dagegen kommt man nicht mit der Vorstellung offener Ketten aus; es wird schwer sein, unter der Masse der Maltosebindungen die Besonderheit des Stärkemoleküls zu ermitteln.

Diese muß nicht nur die Jodfärbung erklären, sondern auch über die Form des Stärkemoleküls Aufschluß geben. Während die Cellulose in Lösung längliche Ellipsoide bildet (W. KUHN), muß die Stärke weniger gestreckt, also stärker geknäuel sein.

Es ist zu erwarten, daß diese und andere Einzelfragen zu einer Spezialisierung der an der Cellulose entwickelten und für die Grundlagen der Stärkechemie maßgebenden Methodik zwingen werden.

4. Kondensierte Gerbstoffe.

Die Entdecker des Resorcins und Phloroglucins, HLASIWETZ, BARTH und mit ihnen die österreichische Schule des vorigen Jahrhunderts, haben in mühsamer systematischer Arbeit mit der von ihnen eingeführten Kalischmelze die Bausteine zahlreicher phenolischer Naturstoffe ermittelt. Wo immer jene amorph, rotliefernden Gerbstoffe herangezogen wurden, trat als Bruchstück Phloroglucin oder seltener Resorcin und daneben ein zweites Phenol, meistens Brenzcatechin, seltener Pyrogallol oder ein anderes Phenol auf. Als später St. v. KOSTANECKIS Lebenswerk vorlag, ergab eine Übersicht über die natürlichen Flavone und Flavonole (Quercetin und seine Verwandten), daß diese niedermolekularen kristallinen Pflanzenpigmente dieselben Bausteine und in derselben Verteilung enthielten. Ihnen gesellte kurz darauf R. WILLSTÄTTER die kristallinen Anthocyanidine zu (Cyanidin und seine Verwandten), von denen dasselbe gilt. Die offensichtliche Verwandtschaft zwischen Flavonfarbstoffen, Anthocyanidinen und den amorphen höher molekularen rotliefernden (d. h. amorphe, rotbraune, unlösliche Kondensationsprodukte, sogenannte Phlobaphene bildenden) natürlichen Gerbstoffen führte zu der Vermutung, daß diese Gerbstoffe Kondensationsprodukte empfindlicher molekulardispenser Phenole aus der nächsten Verwandtschaft der Flavonfarbstoffe und Anthocyanidine sein müssen. Dem einzigen, bis dahin bekannten Naturstoff, der diesen Bedingungen genügt, dem Catechin, hatte man jedoch eine Formel zugeschrieben, die keine Verwandtschaft zu den genannten Pflanzenfarbstoffen erkennen ließ; die Nachprüfung ergab jedoch eine unmittelbare Beziehung, die durch Hydrierung des Cyanidins zu dl-Epi-catechin und sterische Umlagerung desselben in dl-Catechin bekräftigt wurde.



Catechin läßt sich leicht zum Catechu-Gerbstoff kondensieren; ein synthetisches, aus Resorcin (statt Phloroglucin) und Brenzcatechin aufgebautes Catechin kondensiert sich mit äußerster Leichtigkeit zu amorphen Gerbstoffen, die vom Quebracho-Gerbstoff nicht zu unterscheiden sind. Die Kondensationsstelle ist wahrscheinlich der Äthersauerstoff der Catechine, dessen Bindung mit dem benachbarten asymmetrischen C-Atom gesprengt wird. Ein Kernkohlenstoffatom eines zweiten Moleküls gibt seinen Wasserstoff an den Äthersauerstoff des ersten Moleküls ab, der zum Phenolhydroxyl wird; der Kernkohlenstoff des zweiten Moleküls verbindet sich mit dem Kohlenstoff an der ursprünglichen Ätherbindung des ersten Moleküls. Das entstehende dimolekulare Kondensationsprodukt besitzt wieder eine Ätherbindung und ist zu weiterer Kondensation fähig.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß hier ganz andere Wege als bei den voranstehenden Substanzen besprochen werden mußten. Die Ursache ist, daß die Kondensation irreversibel ist; aus den rotbildenden Gerbstoffen lassen sich durch Hydrolyse keine definierten Bausteine isolieren wie aus Tannin oder Polysacchariden. Während bei diesen die Betrachtung vom Baustein ausgeht und nach dessen Bindungsprinzip gefragt wird, muß im Falle dieser Gerbstoffe der zunächst hypothetische und durch Abbau nicht greifbare Baustein aus dem amorphen Kondensationsprodukt heraus konstruiert werden. Der Gedanke (1920), daß solche Naturstoffe überhaupt ein geordnetes System besitzen, das von einem bestimmten Baustein ausgeht, hat sich aus dem Vorstellungskreis E. FISCHERS entwickelt, der sich um Eiweiß, Saccharide und Tannin bewegte. Für den induktiven Vorgang, die Ableitung des zugrundeliegenden Bausteins aus seiner irreversibel veränderten Form in den Gerbstoffen, konnten hier pflanzenchemische Folgerungen verwendet werden; leider stehen sie in so eindringlicher Weise nur sehr selten zur Verfügung.

5. Lignin.

Die bisher geschilderten Wege der Begriffsbildung und Methodik mußten zwangsläufig zum Ligninproblem hinführen. Strenge Linienführung ist hier besonders nötig, denn kein Gebiet ist wie dieses bis in die allerletzte Zeit überschwemmt mit Arbeiten rein beschreibenden Inhalts, die sich mit Extraktionen und Fraktionierungen, Analysen und Molekulargewichtsbestimmungen undefinierter Fraktionen abgeben.

Der Kürze halber wird im folgenden nur von dem Ligninanteil der Fichte gesprochen, der nach Entfernung der Kohlenhydrate und alles Löslichen übrig bleibt, einerlei, ob er in diesem Zustande in der Pflanze vorgebildet ist oder nicht.

In der Ligninchemie lassen sich zwei Wege erkennen, auf denen die Konstitutionsermittlung angestrebt wird.

Nach der einen Art des Vorgehens wird das Lignin wie eine molekulardisperse Substanz behandelt. Man bringt es auf irgend eine Weise in Lösung, bestimmt Molekulargewichte und errechnet aus Elementaranalyse, Methoxylgehalt und Acetylderivat eine Formel, z. B. $C_{46}H_{32}O_6(OCH_3)_5(OH)_5$. Da das Lignin gewisse Farbreaktionen der Aldehyde zeigt, wird eine Aldehydgruppe angenommen, eine Phenolgruppe oder ein Carboxyl sollen der Löslichkeit in Alkali, die gewisse Präparate zeigen, Rechnung tragen usw. Man sucht alsdann, oft ohne quantitative Bestimmung dieser oder anderer Gruppen, aus diesen Feststellungen eine Strukturformel zu entwickeln.

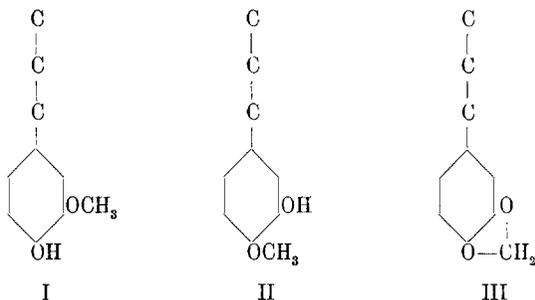
Diese Versuche, die bis in die letzte Zeit fortgesetzt werden, müssen sämtlich scheitern. Denn sie tragen nicht der Tatsache Rechnung, daß jede untersuchte Fraktion ein Gemisch ähnlicher Anteile von verschiedener Molekülgröße ist, die herausgegriffen ist aus einer Folge entsprechender Mischungen von höherem und niedrigerem Molekulargewicht. Tatsächlich ist es unter dem Einfluß dieser Betrachtungsweise nicht einmal möglich gewesen, die Frage zu entscheiden, ob das Lignin eine vorwiegend aromatische Substanz ist oder nicht.

Bei der anderen Betrachtungsweise wird angenommen, daß den vielen ähnlichen Fraktionen als Gemeinsames ein bestimmter *Baustein* zugrundeliegt, daß man es also, mit gewissen Einschränkungen, mit einem polymer-homologen Substanzgemisch zu tun hat. Daraus folgt die Suche nach dem Baustein und es folgt die Notwendigkeit, in *Molekülausschnitten*, nicht in abgeschlossenen selbständigen Molekülen (wie oben) zu denken. Das Prinzip der kontinuierlichen Kondensation muß gewahrt sein, das darin besteht, daß aus zwei Bauelementen (z. B. Aminosäure) ein Zweierstück entsteht, das wiederum die kondensationsbereiten Gruppen (hier NH_2 und $COOH$) des Einerstücks enthält und daher seinerseits im gleichen Sinne weiter reagieren kann. Hierzu kommen biochemische Gesichtspunkte: die zu rekonstruierenden Bausteine müssen biochemisch möglich sein und unter sich eine natürliche Gruppe bilden. Im Verlauf der Untersuchung trat eine weitere

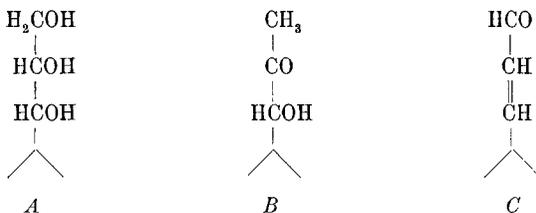
Frage hinzu: ob die Bausteine sich postmortal wahllos kondensieren, wie dies bei den rotbildenden Gerbstoffen der Fall zu sein scheint, oder ob sie sich nach einem physiologisch geregelten Prinzip in der lebenden Membran kondensieren. Das letztere dürfte beim Lignin im wesentlichen zutreffen.

Aus dieser Betrachtungsweise ist die heutige Ligninchemie entwickelt worden. Die begrifflichen Voraussetzungen — Suche nach dem irreversibel der Kondensation anheimgefallenen Baustein — entstammen der Gerbstoffchemie sowie — das Denken in Molekülausschnitten, die kontinuierliche Kondensation — hauptsächlich der Cellulosechemie.

Das bisherige Ergebnis kann hier nur kurz geschildert werden. Die Grundform variiert. Vorherrschend ist das Gerüst des Oxy-methoxy-phenyl-propans in der Anordnung I des Vanillins; daneben kommt vielleicht der Typus des Isovanillins II und sicher der des Piperonals III vor; im Buchenlignin gesellen sich methylierte Pyrogallolderivate hinzu.

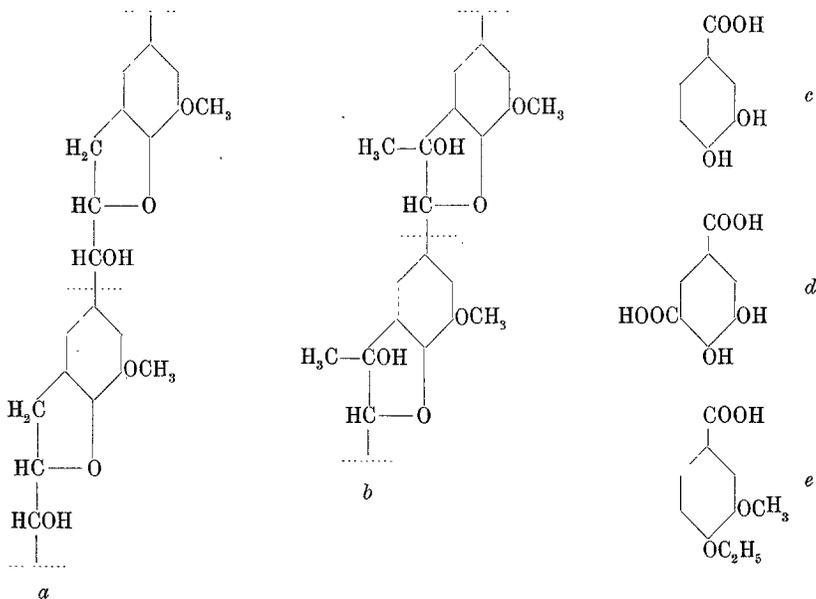


Diese häufig in Pflanzen vergesellschafteten Formen variieren auch in der Seitenkette, und zwar zwischen den eng verwandten Typen des Phenylglycerins *A*, Acetylphenylcarbinols *B* und Zimtaldehyds *C*.



Auch die Art der Verknüpfung scheint zu variieren: der Typus *A* I bildet Doppelglieder *a*, *B* I bildet *b*, usw.

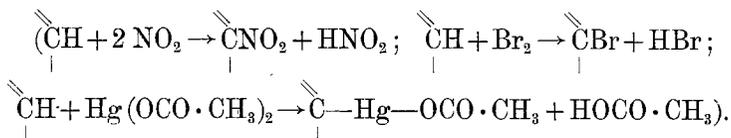
Daneben können einfachere Bindungsarten vorkommen, in denen Hydroxyle der Seitenkette (z. B. in *A* oder *B*) mit Phenolhydroxylen (in I oder II) veräthert sind. Andere Variationsmöglichkeiten sind in den eingangs erwähnten Arbeiten erörtert.



Die Methodik der Experimentalarbeit besteht in der möglichst genauen quantitativen Erfassung der Gruppen und ihrer Kennzeichnung; z. B. der Feststellung, wieviel Brückensauerstoff oder Hydroxyl auf ein Methoxyl entfällt, wieviel von diesem Hydroxyl sekundär (in *a*) oder tertiär (in *b*) ist, oder ob Phenolgruppen darunter sind. Die Auffindung und Bestimmung des abspaltbaren Formaldehyds (aus III) oder der oxydativ entstehenden Essigsäure (aus *b*) sind weitere Beispiele. Vor allem gehört hierhin die Suche nach Spaltstücken; außer Protocatechusäure (*c*) haben sich neuerdings Derivate der Isohemipinsäure (*d*) und nach Alkaliaufschluß, Äthylierung und Oxydation Äthyläthervanillinsäure (*e*) gefunden.

Lignin, ein dreidimensionales Gebilde (Spreitungsversuch), verhält sich wie ein Permutoid, daß auch im ungelösten Zustande „durchreagieren“ kann. Es läßt sich nitrieren, bromieren, mercurieren. Bei der quantitativen Behandlung dieser Reaktionen tritt der Unterschied von den molekulardispersen Stoffen besonders erschwerend hervor. Wenn wir Phenol nitrieren, arbeiten

wir aus der Reaktionsmasse die Nitrophenole heraus und werfen die „Schmierer“. Hier bleiben die Produkte der unvermeidlichen Nebenreaktionen neben denen der Hauptreaktion im Gefüge vergesellschaftet und sind nicht abzutrennen. Daher ist das Gesamtbild selbst so einfacher Reaktionen wie der genannten sehr kompliziert. Trotzdem hat sich erweisen lassen, daß es sich um Substitutionen von Benzolderivaten handelt und nicht um Additionen:



Es konnte ferner festgestellt werden, daß in der „Lignineinheit“ ($1/2 a$, $1/2 b$ etc.) 2 substitutionsbereite Benzolwasserstoffatome zur Verfügung stehen.

Die Behandlung des Lignins erfordert die vereinigte Methodik der Polysaccharide (Denken in Molekülauschnitten, Prinzip der kontinuierlichen Kondensation) und der Gerbstoffe (Suche nach Bausteinen unter Heranziehung biochemischer Betrachtung). Ein Vergleich soll die Fragestellung erläutern:

Man stelle ein Phenolharz her, aber nicht nur aus Phenol und Formaldehyd, sondern gebe Kresole, Acetaldehyd und andere Aldehyde hinzu. Ein Chemiker, der die Herkunft des Stückes nicht kennt, soll seine „Konstitution“ ermitteln. Wenn er das Bauprinzip erkannt hat, wird er nach den Bausteinen suchen. Ähnlich ist die Aufgabe am Lignin.

6. Hochmolekulare Naturstoffe mit spezifischer Wirksamkeit.

Die oben entwickelten Gedankengänge und Methoden dienen der Konstitutionsforschung an Substanzen und Substanzgemischen, die ein unbestimmbares oder für den Rückschuß auf einzelne Gruppen zu großes Molekulargewicht haben. In diesem Sinne werden sie hier hochmolekular genannt. Es gibt Stoffe dieser Art, die eine spezielle physiologische Wirksamkeit besitzen und durch einen biochemischen Test gekennzeichnet werden können, der bei ihrer Bearbeitung in entscheidender Weise herangezogen werden kann. Daher wurde das Arbeitsprogramm auch auf diese Stoffe ausgedehnt.

a) Insulin.

Dieses Hormon ist trotz seiner Kristallisationsfähigkeit ein Eiweißkörper von hohem Molekulargewicht, das heute ungefähr mit 12.000 angegeben werden kann. Es ist gekennzeichnet durch seine Fähigkeit, den Blutzucker, auch den normalen, zu senken. Der hierauf gestützte biochemische Test arbeitet mit einer befriedigenden Genauigkeit, so daß im laufenden Laboratoriumsversuch die Wirksamkeit der Präparate mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ gemessen werden kann.

Insulin kann von der Konstitutionsforschung auf zwei Wegen angegriffen werden. Auf dem ersten wird die Substanz wie jeder andere Eiweißkörper bearbeitet, man hydrolysiert und sucht nach Spaltstücken, insbesondere solchen, die von den gewöhnlichen Aminosäuren abweichen. Man hat keine Besonderheiten finden können. Im Heidelberger Laboratorium wurde ein zweites Verfahren angewendet, in dem versucht wird, die zwischen gewöhnlichen Aminosäuren eingeschaltete spezifische Gruppe *im Verbande* des gesamten Moleküls zu kennzeichnen dadurch, daß man durch möglichst schonende chemische Einwirkung die Wirksamkeit zum Verschwinden bringt, um sie nach Möglichkeit durch andere Einwirkungen wieder hervorzuholen.

So gelang es z. B. durch schonende Acetylierung oder durch Behandlung mit Formaldehyd, unwirksame Präparate herzustellen, die durch sehr vorsichtige Abspaltung der Acetylgruppen oder des Formaldehyds wieder wirksam wurden. Mit Diazomethan (vorher schon durch Alkohol und kalte verdünnte Mineralsäure, CARR) gelingt es gleichfalls, reversibel zu schädigen. Hydrierende Mittel schädigen stark und lassen nur eine sehr unvollkommene Regeneration durch Dehydrierung zu. Oxydierende Mittel sowie Pepsin, Trypsin, Papain schädigen irreversibel. Die Vernichtung der Wirksamkeit durch verdünntestes Alkali kann irreversibel so geführt werden, daß weder Schwefelwasserstoff noch Ammoniak auftreten, die bei Verwendung stärkeren Alkalis abgespalten werden.

Diese Reaktionen lassen sich unterscheiden erstens in solche, die das Insulinmolekül in seiner Gesamtheit verändern. Ihr Ablauf läßt Schlüsse auf die Art der betroffenen Stellen zu, besonders wenn die Regenerierung gelingt. Bei der Acetylierung werden z. B. Amino- und Hydroxylgruppen erfaßt; die Wirksamkeit kehrt wieder unter Bedingungen, die darauf schließen lassen, daß es sich um die Wiederherstellung des Phenolhydroxyls der Ty-

rosingruppen handelt, während Aminogruppen ohne entscheidende Beeinträchtigung der Wirkung teilweise acetyliert bleiben dürfen. Die genannten proteolytischen Fermente schädigen offenbar einfach dadurch, daß sie die Kette zerschlagen und damit die allgemeinen Voraussetzungen für die Wirksamkeit der besonderen Gruppen zerstören.

Reaktionen einer zweiten Art spielen sich an dem besonderen, für die Wirksamkeit verantwortlichen Teile des Moleküls ab. Dahin gehören Oxydation, Veresterung, Hydrierung und Wirkung des Alkalis. Einheitliche Deutungsversuche, bei denen u. a. Lactone, vielleicht Enollactone eine Rolle spielen, sind heute noch nicht möglich; vor allem ist die Rolle der Disulfidgruppen noch ungeklärt.

Wenn auch die Fortschritte zur Kennzeichnung der maßgebenden Atomgruppierungen des Insulins langsam sind, so gelingt es doch, allmählich die zur Erörterung stehenden Möglichkeiten einzuschränken und Anlehnung an bekannte Systeme zu finden. In den letzten Jahren ist besonders in Amerika diese Methode der Kennzeichnung wirksamer Gruppen im Molekülverbande auf die Fermente angewendet worden.

b) Gruppenspezifische Substanzen.

Die soeben geschilderte, für spezifische hochmolekulare Substanzen ausgearbeitete Methodik vereinigt sich mit der für die Polysaccharide anzuwendenden auf dem Gebiete der merkwürdigen Stoffe, die als Träger der von LANDSTEINER entdeckten Blutgruppeneigenschaften (*A*, *B*, Null, *AB*) erkannt sind. Der Test ist ein serologischer; er erlaubt zwar, weniger als ein fünfhundertmillionstel Gramm der *A*-Substanz aus menschlichem Urin erkennbar zu machen, ist aber für analytische Zwecke viel weniger scharf als z. B. der Insulintest. Mit seiner Hilfe gelingt es, die Substanz anzureichern (aus 1000 Litern = 50 kg Trockensubstanz 150 mg) und nachzuweisen, daß die im stickstoffhaltigen Polysaccharid angetroffenen N-Acetylgruppen notwendig für die Wirksamkeit sind. Sie lassen sich durch Baryt entfernen und mit Keten wieder einführen, wobei die zunächst vernichtete Wirksamkeit wiederkehrt; die entacetylierte, unwirksame Substanz läßt sich auch mit Pyridin-Essigsäureanhydrid acetylieren, wobei im Gegensatz zur Acetylierung mit Keten außer den durch Baryt freigelegten Aminogruppen auch die Hydroxyle acetyliert werden. Die durchacetylierte Substanz ist

gleichfalls unwirksam; wenn sie schonend derart entacetyliert wird, daß O-Acetyl abgetrennt, N-Acetyl jedoch erhalten bleibt, so kehrt die Wirksamkeit größtenteils wieder.

Auch die Individuen der Gruppen *B* und Null besitzen ähnliche Polysaccharide von anderer bzw. keiner Wirksamkeit. Die bisherige Erfahrung lehrt, daß die am Insulin entwickelte Methodik hier übersichtlichere Ergebnisse verspricht als am Insulin.

Überblickt man diesen Bericht, so erkennt man, daß die Methodik der Konstitutionsforschung der Ergänzung bedarf, sobald sie Stoffe angreift, deren Molekülen die scharfe Abgrenzung fehlt wegen der Größe des Moleküls oder der Untrennbarkeit von Gemischen. Obwohl jede der geschilderten Substanzen oder Stoffgruppen gesonderte experimentelle Verfahren verlangt, läßt sich erkennen, daß sie sämtlich auf wenige untereinander eng verbundene Vorstellungen zurückgehen, die herauszustellen der Zweck dieser Ausführungen war.