

## Der hydrothermale Abbau von Glucose\*

Von

**O. Bobleter und G. Pape**

Aus dem Atominstitut der Österreichischen Hochschulen, Wien

Mit 3 Abbildungen

*(Eingegangen am 9. März 1968)*

Im Zusammenhang mit hydrothermalen Abbauprobungen von celluloschaltigen Substanzen wurde der Abbau von Glucose in wäßrigen Lösungen unter neutralen Anfangsbedingungen untersucht.

Der analytische Nachweis von Glucose wurde, nach papierchromatographischer Auftrennung, über die Aktivitätsbestimmung der mit  $^{14}\text{C}$  markierten Verbindung durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, daß mit den kolorimetrischen Methoden die erforderliche Genauigkeit nicht erzielt werden kann.

Im Temperaturbereich von 200 bis 300°C folgt der Abbau der Glucose bis zu 90% Umsatz einer Reaktionsgleichung erster Ordnung. Die Aktivierungsenergie beträgt 28,9 kcal/Mol, die Stoßkonstante ist  $8,85 \times 10^9 \text{ sec}^{-1}$ . Die kinetischen Reaktionsdaten lassen die Abbaugeschwindigkeit von Glucose in entsprechenden hydrothermalen Prozessen vorausberechnen.

Die in unserem Jahrhundert andauernde „Bevölkerungsexplosion“ und die damit zusammenhängende kritische Welternährungslage haben auch in Wissenschaft und Technik neue Interessen wachgerufen. Im Vordergrund liegen die biochemischen Synthesen der lebenswichtigen Aminosäuren, in die sich bereits die Erdölindustrie intensiv einschaltet. Ein noch fast ungenütztes Reservoir an Nährbodensubstanzen liegt in den cellulosehaltigen Naturstoffen (Holz, Stroh usw.). Eine wirtschaftliche Herstellung von Glucose aus diesen Substanzen war bisher auf Grund der bekannten Nachteile der Säurehydrolyse noch nicht möglich.

---

\* Herrn Prof. Dr. L. Schmid herzlichst zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

In Vorversuchen, die bis in die ersten fünfziger Jahre zurückgehen, konnte gezeigt werden, daß cellulosehaltige Substanzen bei säurefreier hydrothermalen Behandlung (wäßr. Suspension bei erhöhten Temperaturen und Drücken) abgebaut werden und dabei zu einem gewissen Teil Glucose liefern. Die gegenüber der Cellulose geringe thermische Stabilität der Glucose legte dabei ein Arbeitsverfahren nahe, das in der Erhitzung der Ausgangssubstanz und der raschen Abkühlung der Abbauprodukte, zur weitgehenden Erhaltung der niedermolekularen Bestandteile, besteht<sup>1</sup>. Eine Voraussetzung für dieses Verfahren war die Untersuchung der Kinetik beim hydrothermalen Abbau der Glucose selbst.

Es liegen Untersuchungen vor, die sich mit der Hydrolyse von Glucose in saurem Milieu<sup>2</sup> und mit dem Reaktionsmechanismus bei der alkalischen Hydrolyse<sup>3</sup> befassen. Eine Arbeit von *Stelzig*<sup>4</sup> beschäftigt sich mit dem Saccharose- und Glucosezerfall in Abhängigkeit vom pH-Wert bei verschiedenen Temperaturen. Über die Kinetik der Reaktion von Glucose unter hydrothermalen Bedingungen liegen keine Angaben vor.

#### Quantitative Bestimmung der Glucose

Da unter den gegebenen Reaktionsbedingungen reduzierende Verbindungen auftreten<sup>5</sup>, sind die üblichen titrimetrischen Glucosebestimmungen nach *Willstätter*, *Bertrand* etc. nicht anwendbar. Die erhaltenen Lösungen sind zudem, je nach den Abbaubedingungen, gelb bis braun und meistens trüb, so daß auch polarimetrische Analysen nicht in Frage kommen. Es war daher eine chromatographische Abtrennung der Glucose von den Folgeprodukten erforderlich.

Die in der Literatur angegebenen papierchromatographischen Trennungen<sup>6,7</sup> waren nur in beschränktem Maße anwendbar, da beim hydrothermalen Abbau von Glucose zu einem beträchtlichen Teil  $\omega$ -Hydroxymethylfurfural (*HMF*) entsteht. Dieses verursacht durch weitere Reaktionen die Verfärbung der Lösung<sup>8</sup>. Es entstehen zudem polymere Produkte, die sich auf den Chromatogrammen als braune Streifen vom Startpunkt bis zum Ort des *HMF* hinziehen. Das *HMF* hat einen hohen  $R_f$ -Wert. Die braunen Streifen können als polymere Reihe gedeutet werden, die, beim *HMF* beginnend, zunehmend größere Polymerisationsgrade aufweist. Am Startpunkt werden die unlöslichen Produkte festgehalten. Schon reines *HMF* zeigt bei der Chromatographie schwache Streifenbildung.

<sup>1</sup> O. Bobleter und G. Pape, Österr. Pat. 26 36 61 (15. Oktober 1967).

<sup>2</sup> E. Pummerer und W. Gump, Ber. dtsh. chem. Ges. **56**, 999 (1923).

<sup>3</sup> S. McKibbins, Forest Prod. J. **12**, 17 (1962); K. Kratzl, Österr. Forst- und Holzwirtschaft, Nr. 8, 1954; M. Gibbs, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 3946 (1950).

<sup>4</sup> C. Stelzig, Diss. Techn. Hochschule Berlin D 83, Nr. 68 (1958).

<sup>5</sup> H. Franck, Papierfabr. **17**, 1019 (1919).

<sup>6</sup> R. W. Bailey und J. B. Pridham, Chrom. Rev. **4** (1962).

<sup>7</sup> E. Wittwer, Faserforsch. u. Textilchem. **6**, 58 (1965); C. T. Bishop, Can. J. Chem. **33**, 1073 (1955); S. Partridge, Nature **158**, 270 (1946); F. Cramer, „Papierchromatographie“, Verlag Chemie, Weinheim 1954; E. u. M. Lederer, Chromatographie, Elsevier, 1957; J. Bloch, L. Durrum und G. Zweig, Manual of Paperchromatogr. and Paperelectrophor., Academic Press 1958; F. Micheel, „Chemie der Zucker u. Polysaccharide“, Akadem. Verlagsges. Leipzig 1956; F. Scheffer und R. Kickuth, Z. Anal. Chem. **191**, 116 (1962).

<sup>8</sup> Y. Yoshihiro und M. Nakamura, Kogyo Kagaku Zasshi **63**, 157 (1960).

Die besten Resultate gab das von *Stelzig*<sup>4</sup> verwendete Laufmittel 1-Propanol : Äthylacetat : Wasser = 7 : 1 : 2 (Vol). Glucose wird recht gut von den Begleitstoffen getrennt.

	$R_f$
Glucose	0,26
Glycerinaldehyd	0,49
Dihydroxyaceton	0,56
Methylglyoxal	0,69
Hydroxymethylfurfurol	0,80

Es wurde hauptsächlich nach der aufsteigenden Methode gearbeitet, die es erlaubte, mit besonders großen Papierbogen, Nr. 2043 b von Schleicher & Schüll, zu arbeiten. Die Laufzeiten für eine Trennstrecke von etwa 35 cm lagen zwischen 17 und 22 Stunden, je nach herrschender Temperatur. Dabei verschoben sich die  $R_f$ -Werte nur sehr wenig, die  $R_G$ -Werte, d. h., die auf den  $R_f$ -Wert von Glucose bezogenen  $R$ -Werte, aber praktisch gar nicht. Auf Bogen  $50 \times 50$  cm konnten nebeneinander gleichzeitig 10 verschiedene Hydrolysate und zweimal reine Glucoselösung aufgetragen werden. Diese Bogen wurden dann zu einem Rohr mit etwa 8 cm Radius eingerollt und die Kanten mit weißem Zwirn mit wenigen Stichen so zusammengenäht, daß sie einander gerade noch nicht berühren konnten; wenn die Enden des Bogens einander beim Zusammennähen überlappen, wird das Chromatogramm verzerrt, so daß die  $R_G$ -Werte nicht mehr bestimmt werden können.

Um Glucose und seine Abbauprodukte auf dem Chromatogramm sichtbar zu machen, wurden viele der in der Literatur zitierten Reagentien<sup>6, 7</sup> ausprobiert.  $\text{AgNO}_3$  ist zwar ein empfindliches Reagens, unterscheidet aber nicht zwischen verschiedenen reduzierenden Substanzen. Anilin-Hydrogenphosphat oder -phthalat unterscheidet zwischen Ketosen und Aldosen, der Farbton scheint bei verschiedenen Zuckern verschieden zu sein. Ähnlich wirkt p-Anisidin-Hydrochlorid.

Am empfindlichsten aber und in den Farben am unterschiedlichsten auf verschiedene Substanzen ansprechend war eine Lösung von 0,5 g Benzidin + 10 g Trichloressigsäure in 100 ml Butanol<sup>4</sup>. Nach dem Besprühen des getrockneten Chromatogramms wurde dieses 10 Min. im Trockenschrank bei 95 bis 105° C entwickelt. Glucose gibt einen braunen Fleck, Hydroxymethylfurfurol, das schon in der Kälte farbbildend wirkt, erzeugt einen intensiv orangegelben Fleck.

Die quantitative Bestimmung von Glucose in dem Reaktionsgemisch nach chromatographischer Trennung bereitete anfangs erhebliche Schwierigkeiten. Von den vielen in der Literatur angegebenen Möglichkeiten erreichten wir mit keiner die nötige Genauigkeit.

*Pridham*<sup>6, 9</sup> verwendet p-Anisidin-Hydrochlorid als Reagens. Die Flecken werden aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und in  $\text{SnCl}_2$ -Äthylalkohol-Wasser eluiert. Die Extinktion der farbigen Lösung wird dann im Spektrometer bei 390  $\mu$  gemessen. *Wilson*<sup>10</sup> verfährt ganz ähnlich mit dem Anilinreagens. Beide Methoden wurden überprüft. Dabei

<sup>9</sup> J. B. Pridham, Anal. Chem. **28**, 1967 (1956).

<sup>10</sup> C. M. Wilson, Anal. Chem. **31**, 1199 (1959).

zeigte sich, daß sich der gebildete Farbstoff nicht völlig aus dem Papier auswaschen ließ, auch wenn wir das ausgeschnittene Stück Papier in einem Mikromixer in dem Lösungsmittel zerfaserten. Außerdem war die Extinktion der erhaltenen Lösung abhängig von der Konzentration der verwendeten Zuckerlösung, auch wenn gleiche Mengen Glucose aufgetragen wurden.

Abb. 1 zeigt die mit folgender Methode erhaltenen Kurven: auf ein Chromatographiepapier wurden wachsende Volumina von je drei Glucoselösungen (0,1-, 0,5- und 1proz.) aufgetragen; die Glucosemengen variierten von 5 bis 100  $\mu\text{g}$ . Nach dem Chromatographieren wurde mit Anilinphosphat besprüht, die ausgeschnittenen Flecken im Mixer fein zerteilt und mit Äthanol-HCl ausgewaschen. Die damit erhaltenen Extinktionswerte waren aber bei gleichen Glucosemengen für verschiedene Ausgangskonzentrationen der verwendeten Lösungen verschieden. Daraus ist zu schließen, daß sich der Farbstoff leichter eluieren läßt, wenn wenig Glucose in einem großen Fleck enthalten ist, d. h., daß die Extinktion und damit die scheinbare Glucosemenge von der Konzentration der Glucose am Chromatographiepapier beeinflusst wird. Eine neue Eichkurve wurde aufgestellt durch Auftragen von je 10  $\mu\text{l}$  von 12 verschiedenen konzentrierten Glucoselösungen; dadurch waren alle Flecken am Start gleich groß. Die erhaltenen Werte wiesen trotzdem Abweichungen von  $\pm 15\%$  vom Sollwert auf, außerdem war die Extinktion nur im Bereich zwischen 10 und 60  $\mu\text{g}$  Glucose eine lineare Funktion der Glucosemenge. Ähnliche Effekte traten auf, wenn wir nach Jeffrey<sup>11</sup> zur quantitativen Bestimmung der Zucker, auf Papierchromatogrammen die direkte Messung der Reflexion der mit Anilin-Monochloracetat angefärbten Flecken durchführten; die Fleckengröße beeinflusste die Meßwerte in noch stärkerem Maße.

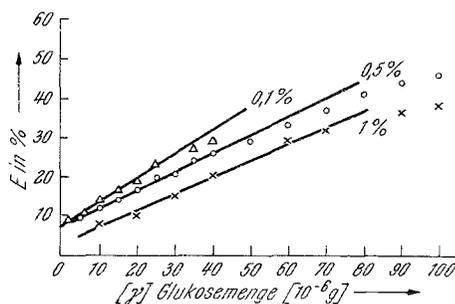


Abb. 1. Abhängigkeit der Extinktion des Glucose-Anilinphosphats (bei 390  $\text{m}\mu$ ) von der aufgetragenen Glucosemenge. Der Extinktionswert ist bei gleicher Glucosemenge auch von der Konzentration der zum Auftragen auf das Papierchromatogramm verwendeten Lösung abhängig

beeinflusst wird. Eine neue Eichkurve wurde aufgestellt durch Auftragen von je 10  $\mu\text{l}$  von 12 verschiedenen konzentrierten Glucoselösungen; dadurch waren alle Flecken am Start gleich groß. Die erhaltenen Werte wiesen trotzdem Abweichungen von  $\pm 15\%$  vom Sollwert auf, außerdem war die Extinktion nur im Bereich zwischen 10 und 60  $\mu\text{g}$  Glucose eine lineare Funktion der Glucosemenge. Ähnliche Effekte traten auf, wenn wir nach Jeffrey<sup>11</sup> zur quantitativen Bestimmung der Zucker, auf Papierchromatogrammen die direkte Messung der Reflexion der mit Anilin-Monochloracetat angefärbten Flecken durchführten; die Fleckengröße beeinflusste die Meßwerte in noch stärkerem Maße.

In neuen Versuchsreihen wurde die Möglichkeit der Verwendung eines radioaktiven Reagens für die Glucosebestimmung untersucht. Das eingesetzte  $^{110}\text{AgNO}_3$  (durch Neutronenbestrahlung im Reaktor über die  $^{109}\text{Ag}[\text{n}, \gamma]^{110}\text{Ag}$ -Reaktion erhalten) gab zwar den Glucosefleck auf dem Papierchromatogramm gut wieder, der aktive Hintergrund konnte

<sup>11</sup> J. E. Jeffrey, E. V. Parilow und W. J. Polglase, Anal. Chem. **32**, 1774 (1960).

aber trotz großer Sorgfalt nicht konstant genug gehalten werden, um zu der erwünschten Analysengenauigkeit zu gelangen.

Bewährt hat sich schließlich die Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -Glucose. Die gleichmäßige Verteilung der aktiven Substanz im Bereich des Fleckes bringt allerdings eine teilweise Absorption der weichen  $\beta$ -Strahlung (0,158 MeV) im Chromatogrammpapier mit sich. Der Absorptionsfaktor erwies sich jedoch als sehr konstant und erlaubte eine Meßausbeute von 18% in einem Friesecke-Höpfner-Methandurchflußzähler. Eine 10proz. Glucoselösung (spezif. Aktivität 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$ ) wurde für die Versuche verwendet. Damit konnte bei einer Auftragung von 20  $\mu\text{l}$  noch 1% der Ausgangskonzentration mit entsprechender Genauigkeit (etwa doppelter Leerwert der Zählanlage) bestimmt werden.

Die quantitative Bestimmung von Glucose und ihren Abbauprodukten war nun sehr einfach, wenn auch zeitraubend. Auf jedes Chromatogramm wurden zwei Punkte mit nicht abgebauter Glucoselösung aufgetragen, sowie je ein Punkt von jedem Hydrolysat. Dann wurde in üblicher Weise chromatographiert, entwickelt, die Flecken ausgeschnitten und ihre Aktivität im Methandurchflußzähler mehrmals gemessen. Aus dem Verhältnis der Zählwerte der Hydrolysate und der unabgebauten Glucose (gemittelt) ergab sich sofort die Restmenge an Glucose in Relativprozent.

#### Abbauversuche und Meßergebnisse

Vorversuche wiesen darauf hin, daß die kinetischen Untersuchungen im Bereich von 200 bis 300° C vorgenommen werden mußten. Um die zu erwartenden maximalen Drücke (der Sättigungsdampfdruck von Wasser bei 300° C ist etwa 87 atm; zusätzlich treten auch etwas gasförmige Abbauprodukte auf) von etwa 100 atm beherrschen zu können, wurden für die Experimente kleine Edelstahl-Autoklaven verwendet.

Ein Autoklav bestand aus einem Rohr (Böhler SAS 10) mit 8 mm Außen- und 6 mm Innendurchmesser. Das eine Ende des etwa 120 mm langen Rohres war verschweißt, das andere mit einer ERMETO-Schneidringverschraubung verschlossen. Die Verschlüsse konnten wiederholt geöffnet werden. Die Dichtungsflächen wurden von Zeit zu Zeit nachpoliert, um ein dichtes Verschießen zu gewährleisten.

Da sich Wasser beim Erwärmen auf 300° C um etwa 30% seines Volumens ausdehnt, lag das nutzbare Volumen dieser Autoklaven bei etwa 2,5 ml. Zur Hydrolyse wurden 10 solcher Autoklaven mit einer 10proz. Lösung radioaktiver Glucose gefüllt, in einen Rost gesteckt und somit alle gleichzeitig in ein elektrisch beheiztes Metallbad eingetaucht. Das Metallbad, das mit einem Rührer umgewälzt wurde, gewährleistete einen vorzüglichen Wärmekontakt. Allerdings war die Wärmekapazität der mit Wasser gefüllten 10 Autoklaven gegen die Kapazität des Metallbades nicht zu vernachlässigen, da sich in diesem beim Eintauchen ein Temperaturabfall von etwa 7° C ergab. Da alle Autoklaven gleichzeitig eingetaucht wurden, waren die Temperaturbedingungen für alle Proben anfangs gleich. Durch Anfertigen einer genauen Eichkurve war es auch möglich, die Heizung des Bades auf die nach dem Eintauchen der Autoklaven sich einstellende Temperatur so einzuregulieren, daß sich im Verlauf

der Hydrolyse niemals größere Temperaturschwankungen als  $\pm 1^\circ \text{C}$  ergaben. Die Temperatur wurde mit einem Thermoelement aus Ni—CrNi gemessen. Nach genau gemessener Zeit wurde jeweils ein Autoklav dem Bad entnommen und mit kaltem Wasser abgekühlt, um die Reaktion sofort abzubrechen. Die Autoklaven wurden sodann entleert und die meist braun gefärbte, nach Karamel riechende Lösung analysiert.

In Tab. 1 ist eine der 20 durchgeführten Versuchsreihen ( $240^\circ \text{C}$ ) wiedergegeben.

Tabelle 1. Glucoseabbau

1 ml Glucoselösung pro Autoklav; Reaktionstemp.  $240^\circ \text{C}$ ; spezif. Aktivität  $0,4 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $t$  = korrigierte Reaktionszeit in Min.; Imp/10 Min. = Impulse pro 10 Min.; I—L = Impulse pro 10 Min.—Leerwert; % Rest = die nach dem Abbau gefundene Restmenge an Glucose in Prozent der Anfangsmenge.

1	2	3	4	5	6
Vers.	$t$	Imp/10 Min.	Mittel	I—L	% Rest
1	1	23 896 23 640	23 768	23 474	78,3
2	2	17 299 17 854	17 576	17 282	57,6
3	3	13 865 13 979	13 922	13 628	45,4
4	4	9 986 10 286	10 136	9 842	33,8
5	5	6 979 6 877	6 928	6 634	22,1
6	6	5 801 5 526	5 664	5 370	17,9
7	7	Autoklav undicht			
8	8	3 676 3 396	3 536	3 242	10,8
9	12	2 512 2 208	2 360	2 066	6,9
10	18	2 023 1 869	1 946	1 652	5,5
100%	—	29 787 30 821	30 304	30 010	
Leerwert L		314 287 307 268	294		

Die prozentuellen Restmengen an Glucose sind in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ( $t$ ) für verschiedene Temperaturen in Abb. 2 dargestellt.

Bei der graphischen Auftragung stellte sich heraus, daß die Reaktion erst nach 0,8 Minuten einsetzt. Die Anheizzeit betrug daher trotz günstiger Bedingungen fast 1 Minute. Sowohl in Tab. 1 als auch in der Abb. 2 wurde daher die Anheizzeit (0,8 Min.) von der Gesamtreaktionszeit abgezogen und die korrigierten Werte angegeben.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, handelt es sich beim Glucoseabbau um eine Reaktion erster Ordnung. Über einen Konzentrationsbereich von 90% ist

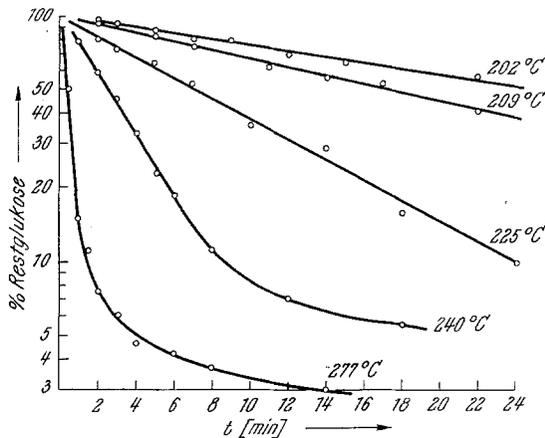


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Glucosekonzentration von der Reaktionszeit ( $t$  in Min.). Die Konzentration ist, in logarithmischer Auftragung, in Prozenten der Ausgangskonzentration aufgetragen. Reaktionstemp. zwischen 202 und 277°C

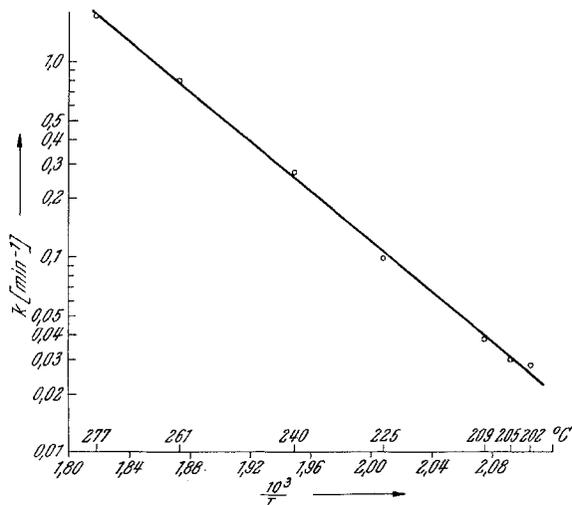


Abb. 3. Abhängigkeit der Reaktionskonstanten ( $k$ ) des Glucoseabbaues als Funktion der reziproken Temperatur ( $1/T$ )

diese Reaktionsordnung sehr gut erfüllt. Nur bei den letzten 10% verlangsamt sich der Glucoseabbau bedeutend. Unter den gebildeten Abbauprodukten befinden sich auch verschiedene organische Säuren, die den pH-Wert im Verlauf der Reaktion erniedrigen. Da Glucose in schwach saurem Bereich stabiler als

in neutralem ist, erklärt sich die Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Abbaugraden.

Aus den Abbaukurven konnten die Reaktionskonstanten für den Glucoseabbau bei verschiedenen Temperaturen berechnet werden. In Abb. 3 sind die Reaktionskonstanten als Funktion der reziproken Temperatur aufgetragen. Aus der dabei erhaltenen Geraden errechnet sich eine Aktivierungsenergie ( $E$ ) von

$$E = 28,9 \text{ [kcal/Mol]}$$

und ein Stoßfaktor ( $A$ ) von

$$A = 8,8 \cdot 10^9 \text{ [sec}^{-1}\text{]}.$$

Der niedere Stoßfaktor ist durch die komplizierte intramolekulare Reaktion zu erklären, die unter anderem mit etwa 50% Ausb. zu  $\alpha$ -Hydroxymethylfurfurol führt. In Parallelreaktionen (siehe *Stelzig*<sup>4</sup> und *Bishop*<sup>7</sup>) werden Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton u. a. m. gebildet.

Aus den Abbaukurven (Abb. 2) geht hervor, daß beim hydrothermalen Abbau von Glucose bei 240° C in einer Minute schon 22% zersetzt sind. Bei einer Reaktionstemperatur von 277° C sind bereits nach 30 Sek. 50% der Glucose zerstört. Daraus kann ersehen werden, wie wichtig die genaue Kenntnis der kinetischen Daten des Glucoseabbaues für die Erstellung eines Verfahrens zur hydrothermalen Bildung von Glucose aus cellulosehaltigen Materialien<sup>1</sup> ist.

Wir möchten nicht versäumen, dem Österreichischen Forschungsrat und den Herren Professoren Dr. G. Ortner, Dr. F. Hecht und Dr. K. Kratzl für die gewährte Unterstützung und die Förderung dieser Arbeit herzlichst zu danken.