

Zur kolorimetrischen Methode der Bestimmung der Molekulargröße von Polysacchariden.

Von

Dr. Leonhard Wacker,

Chemiker am pathologischen Institut der Universität München.

(Der Redaktion zugegangen am 5. Februar 1911.)

Die Farbstoffbildung aus Kohlenhydraten und *p*-Phenylhydrazinsulfosäure bei Gegenwart von Natronlauge ist ein Autoxydationsvorgang, dem wahrscheinlich eine primäre Reaktion wie Hydrazon- oder Osazonbildung vorangeht. Sie ist insofern interessant, als molekulare Kohlenhydratmengen konstante Farbstärke¹⁾ liefern, sodaß man aus der Intensität der Farbe vor und nach der Inversion einen Rückschluß auf die Anzahl der im Polysaccharid verkuppelten Hexose-Einheiten ziehen kann.

Gleiche Gewichtsmengen von Polysacchariden verschiedener Molekulargröße liefern nach der Inversion theoretisch nahezu gleiche Ausbeute an Hexose, dementsprechend zeigt auch das Experiment der Farbstoffbildung, daß gleiche Gewichtsmengen von Polysacchariden nach erfolgter Inversion gleich farbstarke Reaktion liefern, während die nicht invertierten Polysaccharide um so viele Male schwächer sind, als die Anzahl Hexosen beträgt, aus denen sich das Polysaccharidmolekül zusammensetzt. Es liefern beispielsweise 100 Teile eines Dextrins mit 4 Hexosen $[(C_6H_{10}O_5)_4H_2O]$ nach der Inversion 108,1 Teile Traubenzucker $(4C_6H_{12}O_6)$, während aus einem Polysaccharid mit 10 Hexosen theoretisch 109,8 Teile Hexose entstehen. Der Unterschied in der Ausbeute an Hexose zwischen beiden Polysacchariden ist sehr gering (1,7%). Die aus gleichen Gewichtsmengen der Polysaccharide erhältlichen Inversionsprodukte differieren somit bezüglich der Farbstärke auch nur um 1,7%, ein Unterschied, der bei der Farbreaktion kaum erkennbar ist. Die Zunahme an Farbintensität, welche die

¹⁾ Leonh. Wacker, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 266 (1908); Bd. XLII, S. 2675 (1909).

beiden erwähnten Polysaccharide nach der Inversion gegenüber der gleichen Traubenzuckermenge erfahren, beträgt 8,1 bzw. 9,8%, entsprechend der Ausbeute an Hexose aus den Polysacchariden. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß man bei der kolorimetrischen Molekulargewichtsbestimmung nicht nötig hat, die Farbstärke nach der Inversion festzustellen, solange Produkte von der allgemeinen Formel $(C_6H_{10}O_5)_nH_2O$ in Frage kommen, da die Intensität konstant ist bzw. mit steigendem Molekulargewicht des Polysaccharids ganz wenig zunimmt. (Die Differenz zwischen einem Polysaccharid von 4 und 10 Hexosen beträgt nur 1,7%.)

Die konstante Farbstärke (im Mittel 109, bei Traubenzucker = 100, siehe Tabelle II) der Polysaccharide nach der Inversion dividiert durch die, je nach der Größe des Moleküls variable Farbstärke vor der Inversion ergibt die Molekülgröße d. h. die Zahl, welche früher als Inversionsquotient bezeichnet wurde.

Gegenüber diesen Verhältnissen nimmt die Lävulose eine Ausnahmestellung ein, insofern als Lävulose und invertierte lävulosehaltige Polysaccharide eine intensivere Farbreaktion liefern, als die Theorie erfordert. Vielleicht steht diese Erscheinung mit dem Ketose-Charakter der Lävulose in Zusammenhang oder sie ist auf die Zerlegbarkeit durch Alkali zurückzuführen.

In dieser Zeitschrift¹⁾ habe ich jüngst eine kolorimetrische Blutzuckerbestimmungsmethode beschrieben und erwähnt, daß sich dieselbe vorzüglich zur Molekulargewichtsbestimmung eignet. Ich habe daher die Farbstärke äquimolekularer Kohlenhydratmengen nochmals, gegen Traubenzucker als Typ, verglichen und die Resultate in der folgenden Tafel I niedergelegt.

Die zum Vergleiche der Färbungen hergestellte Farbskala ermöglicht, Unterschiede von 0,02 bis 0,05 mg Traubenzucker oder äquimolekularer Mengen eines andern Kohlenhydrats zu erkennen bzw. quantitativ nachzuweisen. Zur Herstellung dieser Skala verfährt man wie folgt (loc. cit. S. 205): Zu 0,5, 1,0, 1,5 bis 8,0 ccm einer 0,01%igen Traubenzuckerlösung,

¹⁾ L. Wacker. Diese Zeitschrift. Bd. LXVII, S. 196 (1910).

Die folgende Tabelle gibt die Farbstärke einiger Kohlenhydrate und mehrwertiger Alkohole mit p-Phenylhydrazinsulfosäure verglichen mit Traubenzucker.

Tabelle I.

Nr.	Name	Konzentration der Kohlenhydratlösung in %	Anzahl der verwendeten Kubikmeter Kohlenhydratlösung	Farbstärke F_1 der Kohlenhydratlösung verglichen mit Traubenzuckerlösung 0,01 %	Theoretisch berechnete Farbstärke in Kubikmeter 0,01 % Traubenzuckerlösung	Farbstärke berechnet auf Traubenzucker = 100	Anzahl der angestellten Versuche
1	Glycerin	0,01	1,0	2,2 ¹⁾	—	108	1
			1,5	3,2	—		
			2,5	5,0	4,89		
2	Arabinose	0,01	1,5	2,2	—	121	1
			2,5	3,6	3,0		
3	Mannit	0,01	2,5	6,2	2,47	251	5
4	Lävulose	0,01	2,5	3,5	2,5	140	9
5	Inosit	0,01	2,5	—	—	—	5
6	Galaktose	0,01	2,5	2,3	2,5	92	4
7	Mannose	0,01	2,5	2,4	2,5	96	6
8	Maltose	0,02	2,5	2,3	2,5	92	6
9	Milchzucker	0,02	2,5	2,5	2,5	100	3
10	Rohrzucker	0,02	2,5	2,2	2,5	89	6
11	Raffinose	0,03	2,5	2,5	2,5	100	7
12	Achroodextrin	0,04	2,5	2,7	—	—	5
13	Erythrodextrin	0,04	2,5	2,5	—	—	5
14	Stärke (natürl. Gemisch)	0,07	2,5	2,8	—	—	2
15	Glykogen	0,09	2,5	2,9	—	—	3
16	Gummi arabic. ²⁾	0,14	2,5	2,4	—	—	2

¹⁾ Die Bruchzahlen in der Farbstärke, wie z. B. 2,2 oder 2,6, wurden erhalten durch Vergleich mit der Skala einerseits und andererseits durch Vergleich der verschiedenen Kohlenhydratfärbungen unter sich.

²⁾ Das zu den Pentosanen zählende Gummi arabicum, in möglichst reiner käuflicher Form, enthält 2,61% Asche.

die auf 16 gleichweite Glaszylinder von 31 mm Durchmesser verteilt und mit Wasser auf 10 ccm Flüssigkeit ergänzt sind, fügt man 2 ccm einer p-Phenylhydrazinsulfosäurelösung (enthaltend 0,04 g) und 2 ccm Natronlauge 33 %ig. Gegen diese Skala vergleicht man 2,5 ccm der zu untersuchenden Kohlenhydratlösung, nachdem man vorher gleichfalls mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt und die Reagenzien beigefügt hat nach 4 stündigem Stehen unter häufigem Umschütteln.

Aus der vorstehenden Tabelle ergibt sich, daß die Kohlenhydrate bekannter Molekulargröße unter Nr. 6 bis 11 konstante Farbstärke, mit Schwankungen bis zu 11 %, liefern, sie zeigt ferner die Ausnahmestellung der Lävulose, des Mannits und des Inosits. Letzterer liefert als sekundärer Alkohol in dieser Verdünnung, gemäß früherer Mitteilung, überhaupt keine Rotfärbung, sondern reagiert erst in einer 10 fachen Konzentration. Mannit ist ziemlich genau 2,5 mal stärker, als die Theorie erfordert, und die Lävulose ist 40 % zu stark.

Die Tatsache, daß gleiche Gewichtsmengen invertierter, lävulosefreier Polysaccharide theoretisch gleiche Farbstärken liefern, ergibt sich in übersichtlicher Weise aus der folgenden Zusammenstellung.

Tabelle II.

$n(C_6H_{10}O_5)H_2O$	Molekulargewicht	$nC_6H_{12}O_6$ invertierte Polysaccharide	Ausbeute an invertiertem Kohlenhydrat aus den Poly- sacchariden in %	2,5 ccm invertierte Kohlenhydratlösung 0,01 %ig sind gleiche Anzahl Kubikzenti- meter Traubenzucker- lösung 0,01 %ig
3	504	540	107,1	2,67
4	666	720	108,1	2,70
5	828	900	108,7	2,72
6	990	1 080	109,1	2,73
7	1 152	1 260	109,3	2,73
8	1 314	1 440	109,5	2,74
9	1 476	1 620	109,7	2,74
10	1 638	1 800	109,8	2,74
20	3 258	3 600	110,4	2,76
100	16 218	18 000	110,9	2,77

2,5 ccm einer invertierten 0,01 %igen Polysaccharidlösung sind somit bezüglich des Farbstoffbildungsvermögens theoretisch gleich 2,67 bis 2,74 ccm einer 0,01 %igen Traubenzuckerlösung, je nachdem sich das Molekül aus 3 bis 10 Hexosen zusammensetzt. Aus dieser geringen Differenz folgt, daß die Inversion bei der Molekulargewichtsbestimmung in Wegfall kommen kann, da ein Mittelwert (109 entsprechend 2,725) zur Berechnung genügt.

Die praktischen Ergebnisse bei der Inversion gleicher Gewichtsmengen verschiedener Polysaccharide sind in der Tabelle III wiedergegeben. Gleichzeitig wurden auch Traubenzucker und Lävulose auf Säurebeständigkeit geprüft. Weiter enthält die Zusammenstellung der Tabelle III eine Umrechnung der Farbstärke nach der Invertierung auf die Substanzmengen der Tafel I (molekulare Mengen).

Die fett gedruckten Zahlen unter Nr. 5—10 stellen die Farbstärke von 2,5 ccm invertierter 0,01 %iger Polysaccharidlösung dar verglichen mit 0,01 %iger Traubenzuckerlösung. Die ziemlich konstanten Werte nähern sich im Mittel der Zahl 2,7. Demgegenüber liefern Lävulose und lävulosehaltige Polysaccharide intensivere Färbungen (Nr. 1—3). Die Intensität der Färbung nimmt mit dem Lävulosegehalt des Moleküls ab¹⁾.

Traubenzucker erweist sich als säurebeständig, während Lävulose auch durch Säure zersetzt zu werden scheint, da die Farbstärke etwas zunimmt.

In der folgenden Tafel IV sind die mit der Hydrazinsulfosäure erzeugten Färbungen einiger Polysaccharide bei Zugrundelegung gleicher Substanzmengen vor und nach der Inversion gemäß den Ergebnissen nach Tafel I und III vergleichend zusammengestellt. Durch Division der Farbstärke F_1 , vor der Inversion, in die Farbstärke F_2 , nach der Inversion, wurde der Inversionsquotient, d. h. die Anzahl Hexosen des Polysaccharids berechnet. F_b ist die theoretisch berechnete

¹⁾ Die Lävulose und lävulosehaltigen Polysaccharide färben sich bei der Inversion nach Verfahren I gelb. Die Intensität dieser Gelbfärbung nimmt gleichfalls mit fallendem Lävulosegehalt ab.

Farbstärke einiger Polysaccharide (und Hexosen) nach der Inversion mit Salzsäure, verglichen mit Traubenzucker in 0,01 % iger Lösung.

Tabelle III.

Nr.	Name	Konzentration der invertierten Lösung in %	Anzahl der Kubikzentimeter invertierten Polysaccharids	Farbstärke des invertierten Polysaccharids verglichen mit Traubenzucker 0,01 %	Mittlere Farbstärke von 2,5 ccm einer 0,01 % igen Lösung des invertierten Polysaccharids	Umrechnung auf Substanzmengen der Tabelle I		Inversionsmethode ¹⁾
						Konzentration in %	Farbstärke F ₂ nach der Inversion	
1	Lävulose	0,01	2,5	4,3	4,1	0,01	4,1	I
			2,5	4,0				II
2	Rohrzucker	0,01	2,5	3,5	3,5	0,02	7,0	I
			2,5	3,5				II
			5,0	7,0				II
3	Raffinose	0,01	2,5	3,3	3,3	0,03	9,9	I
			2,5	2,4 ²⁾				II
4	Traubenzucker	0,01	2,5	2,6	2,6	0,01	2,6	I
5	Milchzucker	0,01	2,5	2,6	2,5	0,02	5,1	I
			5,0	5,0				I
6	Maltose	0,01	2,5	2,5	2,6	0,02	5,2	I
			5,0	5,5				I
7	Achroodextrin	0,01	2,5	2,7	2,7	0,04	10,8	I
8	Erythroextrin	0,01	2,5	2,7	2,7	0,04	10,8	I
9	Stärke (natürl. Gemisch)	0,01	2,5	2,8	2,7	0,07	18,9	I
			5,0	5,5				I
			2,5	2,7				I
10	Glykogen	0,01	2,5	3,0	2,8	0,09	25,2	I
			5,0	5,3				I
11	Gummi arabicum	0,01	2,5	2,5	2,5	0,14	36,0	I
			5,0	5,3				I

¹⁾ Zur Inversion wurden 2 verschiedene Verfahren eingeschlagen: I. 0,1 g Polysaccharid wurden mit 25 ccm Wasser in 1,7 ccm konzentrierter Salzsäure (ca. 38 % ige) 3 Stunden im kochenden Wasserbad mit Rückflußkühlung erhitzt und dann auf 1 Liter Flüssigkeit verdünnt. II. Vorschrift d. deutschen Zuckerindustriellen. (Siehe Eisner, Praxis d. Chemikers, 8. Aufl., S. 358.) Unter denselben Konzentrationsverhältnissen wie vorher, erhitzt man 5 Minuten lang auf 69° C.

²⁾ Nicht vollständig invertiert. Vgl. Lippmann, «Chemie der Zuckerarten», 3. Aufl., S. 1640.

³⁾ Die Stärke wurde vor der Inversion mehrere Stunden im Druckkölbchen auf 105° erhitzt.

Farbstärke der Polysaccharide nach der Inversion (d. h. = 109, wenn Traubenzucker = 100). Die Zahl 2,725 ist demnach die mittlere berechnete Farbstärke von 2,5 ccm einer invertierten 0,01%igen Polysaccharidlösung $\left(\frac{2,5 \times 109}{100} = 2,725\right)$. Durch Umrechnung auf die Konzentration der Kohlenhydratlösung erhält man daraus Fb. Die Inversionsquotienten $\frac{F_b}{F_1}$ und $\frac{F_2}{F_1}$ sind nahezu gleich, wodurch bewiesen ist, daß die Inversion praktisch in Wegfall kommen kann. Die Inversionsquotienten sind in Bruchzahlen angegeben, obschon natürlich nur ganze Hexosemoleküle in Frage kommen können. In einer weiteren Rubrik der Tafel IV sind daher die betr. Bruchzahlen auf ganze Zahlen auf- bzw. abgerundet.

Tabelle IV.

Nr.	Name	Konzentration c der Kohlenhydratlösungen %	Anzahl der verwendeten Kubikzentimeter	F_1	F_2	Inversionsquotient $\frac{F_2}{F_1}$	$F_b = c \times 2,725 \times 100$	Inversionsquotient $\frac{F_b}{F_1}$	Ab-rundungs-zahlen
1	Rohrzucker	0,02	2,5	2,2	7,0	3,1	5,45	2,4	2 (3)
2	Milchzucker	0,02	2,5	2,5	5,1	2,0	5,45	2,1	2
3	Maltose	0,02	2,5	2,3	5,2	2,2	5,45	2,3	2
4	Raffinose	0,03	2,5	2,5	9,9	3,9	8,17	3,2	3 (4)
5	Achroodextrin	0,04	2,5	2,7	10,8	4,0	10,90	4,0	4 ¹⁾
6	Erythro-dextrin	0,04	2,5	2,5	10,8	4,3	10,90	4,3	4
7	Stärke (natürlich. Gemisch)	0,07	2,5	2,8	18,9	6,7	19,10	6,8	7
8	Glykogen	0,09	2,5	2,9	25,2	8,6	24,52	8,4	8—9 ²⁾

¹⁾ Achroo- und Erythro-dextrin sind demnach von gleicher Molekulargröße. Vielleicht ist dies so zu deuten, daß Achroodextrin beim Abbau von Stärkecellulose und Erythro-dextrin beim Zerfall von Granulose entsteht. Das Verhalten der beiden Dextrine, sowie der genannten Stärkebestandteile gegen Jod würde darauf hinweisen.

²⁾ Das Glykogenmolekül ist gegenüber früheren Angaben kleiner.

Die kolorimetrische Methode auf lävulosehaltige Polysaccharide (Nr. 1 u. 4) übertragen, kann aus erwähnten Gründen bei der Inversion zu Täuschungen Veranlassung geben, dagegen verhalten sich die nicht invertierten Kohlenhydrate (Rohrzucker und Raffinose) normal und passen in die Reihe hinein (vgl. auch Tafel I, Nr. 10 und 11). Unter Zuhilfenahme der für Derivate des Traubenzuckers gültigen Mittelzahl (Fb) erhält man auch bei Rohrzucker und Raffinose den richtigen Inversionsquotienten.

In einer früheren Mitteilung (*loc. cit.*) habe ich die Zerlegbarkeit der Polysaccharide unter dem Einflusse der bei der Methode verwendeten Alkalilauge besprochen. Diese Verhältnisse habe ich eingehend geprüft. (Vgl. Tafel V.)

Die Prüfung der Alkaliempfindlichkeit wurde in der Weise durchgeführt, daß die Kohlenhydratlösungen, in der bei den Versuchen eingehaltenen Konzentration, längere Zeit der Einwirkung von Natronlauge exponiert und dann gegen die gleiche Menge eines frischen Ansatzes verglichen wurden, welche nicht mit Lauge vorbehandelt worden war.

Aus den Versuchen geht hervor, daß bei einer kurzen Einwirkungszeit der Natronlauge, welche etwa der Dauer der Farbstoffbildung entspricht, die Veränderung durch Alkali (mit Ausnahme der Lävulose) gering ist. Bei längerer Einwirkung findet eine Zerlegung der Kohlenhydrate statt, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Farbtintensität zunimmt. Die Zerlegbarkeit der Kohlenhydrate durch ätzende und kohlen-saure Alkalien,¹⁾ schon ohne die Mithilfe von Fermenten, ist von physiologischem Interesse, denn es ist vielleicht kein Zufall, daß der Organismus des Diabetikers gegenüber jenen Kohlenhydraten und ähnlichen Substanzen (Lävulose, Mannit), welche die stärkere Empfindlichkeit gegen die Alkalien zeigen, die größere Toleranz aufweist. Auch die Resistenz des Glykogens gegen Alkali ist bemerkenswert.

Sämtliches Glykogen des Handels ist stark durch Eiweiß verunreinigt und liefert daher eine zu große Hexoseanzahl.

¹⁾ L. Wacker, Das Glykogen und die Kohlenhydrate des Blutes. Sitzungsberichte d. physikal.-medizin. Gesellsch. Würzburg, Januar 1910. —

Verhalten der Hexosen und Polysaccharide gegen ca. 5%ige Natronlauge.
Tabelle V.

Nr.	Name	Konzentration der Kohlenhydratlösung in %	Anzahl der verwendeten Kubikzentimet. Kohlenhydratlösung	Einwirkungsdauer der 5%igen Natronlauge Std. u. Min.	Farbstärke nach dem Einfluß der Lauge	Farbstärke ohne Vorbehandlung mit Lauge
1	Traubenzucker	0,01	2,5	1 15	2,8	2,5
		0,01	2,5	2 —	2,8	2,5
		0,01	2,5	17 —	3,5	2,5
		0,01	2,5	41 —	3,5	2,5
2	Lävulose	0,01	2,5	— 28	4,5	3,6
		0,01	2,5	1 15	5,5	3,5
		0,01	2,5	17 —	4,3	3,6
		0,01	2,5	41 —	3,4	3,5
3	Galaktose	0,01	2,5	2 —	2,6	2,4
		0,01	2,5	17 —	3,5	2,4
		0,01	2,5	41 —	3,5	2,4
		0,01	2,5	17 —	3,0	2,4
4	Mannose	0,01	2,5	17 —	3,0	2,4
		0,01	2,5	41 —	3,2	2,4
		0,01	2,5	41 —	3,2	2,4
		0,01	2,5	17 —	4,0	2,3
5	Maltose	0,02	2,5	2 —	2,4	2,2
		0,02	2,5	17 —	4,0	2,3
		0,02	2,5	41 —	5,2	2,3
		0,02	2,5	2 —	2,7	2,6
6	Milchzucker	0,02	2,5	2 —	2,7	2,6
		0,02	2,5	17 —	4,3	2,5
		0,02	2,5	41 —	5,5	2,5
		0,02	2,5	2 —	2,5	2,1
7	Rohrzucker	0,02	2,5	2 —	2,5	2,1
		0,02	2,5	17 —	2,4	2,2
		0,02	2,5	41 —	2,5	2,2
		0,02	2,5	2 —	2,8	2,7
8	Raffinose	0,03	2,5	2 —	2,8	2,7
		0,03	2,5	17 —	2,8	2,5
		0,03	2,5	41 —	3,0	2,5
		0,03	2,5	2 —	3,1	2,7
9	Achroodextrin	0,04	2,5	2 —	3,1	2,7
		0,04	2,5	15 —	4,9	2,7
10	Erythroextrin	0,04	2,5	2 —	2,7	2,5
		0,04	2,5	15 —	3,9	2,5
11	Stärke	0,07	2,5	2 —	3,3	2,8
		0,07	2,5	14 —	3,7	2,8
		0,07	2,5	41 —	5,8	2,8
12	Glykogen	0,09	2,5	1 15	2,9	2,9
		0,09	2,5	17 —	2,9	2,9
		0,09	2,5	41 —	2,7	2,9

Interessant ist ferner, daß bei längerer Einwirkung (41 Stunden) der Lauge auf die Hexosen (vgl. Tafel V, Nr. 1, 2, 3 und 4) sich die Farbintensität ungefähr auf eine konstante Zahl der Skala einstellt. Während Lävulose gegen Alkali sehr empfindlich ist, sind die lävulosehaltigen Polysaccharide «Rohrzucker und Raffinose» gegen Alkalien ziemlich widerstandsfähig¹⁾.

Die Veränderung der Hexosen durch Laugen läßt sich im Polarisationsapparat verfolgen und decken sich die Befunde nach Tafel V mit den Resultaten der Untersuchung anderer Autoren²⁾.

München, patholog. Institut der Univers., Februar 1911.

L. Wacker und Fr. Poly, Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel. Deutsch. Archiv f. klin. Medizin, Bd. C, 1910, S. 571. Festschrift auf v. Leube, Verlag von F. C. W. Vogel, Leipzig 1910.

¹⁾ Lippmann, Chemie der Zuckerarten (Braunschweig 1904), S. 231, 232, 1238, 1640.

²⁾ Ebendort, S. 330, 342, 343, 615, 713, 835, 1475, 1546. — A. Jolles, Beiträge zur Kenntnis der Kohlenhydrate. Zentralblatt d. gesamten Medizin. Nr. 1, 1911.