Ueber Chondroitinschwefelsäure;

von *Sigmund Fränkel*.

Aus dem Laboratorium der Spiegler-Stiftung in Wien
(Leiter S. Fränkel).

(Eingelaufen beim Redactions-Comité der Lieben-Festschrift
am 12. Juni 1906.)

Die Chondroitinschwefelsäure wurde von Karl Theodor Mörner (Skandinavisches Archiv für Physiologie 1, 210) entdeckt und dann auf das Eingehendste von Schmiedeberg (Archiv für experimentelle Pathologie 28, 355) untersucht, dem es zuerst gelungen war, die Chondroitinschwefelsäure rein darzustellen und zur Analyse zu bringen. Die Chondroitinschwefelsäure ist als eine Aetherschwefelsäure aufzufassen, bei der die Schwefelsäure mit einer organischen Säure, $C_{18}H_{27}O_{14}N$, dem Chondroitin, gepaart ist. Das Chondroitin ist eine nicht reducirende Substanz, welche aber beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren in eine reducirende Säure übergeht, das Chondrosin, $C_{12}H_{21}O_{11}N$. Schmiedeberg konnte diese Säure mittelst Mineralsäuren nicht weiter zerlegen, hingegen erhielt er beim Erwärmen mit Baryt aus dem Chondrosin Verbindungen, die er als Zersetzungsproducte der Glycuronsäure und des Glycosamins auffasste. Er kam zu dem Resultate, dass das Chondrosin eine Verbindung der Glycuronsäure mit Glycosamin sei und dass der Chondroitinschwefelsäure, dem Chondroitin und dem Chondrosin die folgenden Formeln zukommen, wobei er die als Spaltungs-

product auftretende Essigsäure als Spaltling einer o-Acetylacetessigsäure ansieht:

Chondrosin.

(Constitutionsformeln nach O. Schmiedeberg.)

Diese Folgerungen Schmiedeberg's sind aber durch die Arbeit von Orgler und Neuberg (Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 407) sehr erschüttert worden. Diese beiden Forscher bezweifeln vorerst auf Grund von Molekulargewichtsbestimmungen die einfache Formel des Chondrosinsulfates, welchem nach diesen Bestimmungen die doppelte oder dreifache Molekulargrösse zukommen müsste. Ferner wenden sie gegen die Annahme eines Glycuronsäurecomplexes ein, dass die Orcin- und Phloroglucinprobe negativ ausfalle und dass man auch bei der Destillation mit verdünnter Salzsäure kein Furfurol aus der Chondroitinschwefelsäure erhält. Schliesslich erhielten sie bei der Barytspaltung des Chondrosins eine Substanz, welche ein schön krystallisirendes Kupfersalz giebt, keine Kohlehydratreaction mehr zeigt und Fehling'sche Lösung nicht reducirt. Diese Substanz, $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}$, fassen Orgler und Neuberg als Tetraoxyaminocaprinsäure auf. Es ist ihnen auf keine Weise gelungen, eine Glycosamincomponente in dem Chondrosin nachzuweisen.

Meine Untersuchungen wurden mit Chondroitinschwefelsäure ausgeführt, die nach dem Verfahren von Oddi (Archiv f.

experimentelle Pathologie **33**, 376) dargestellt wurde, mit einigen Modificationen, die in der ausführlichen Publication später beschrieben werden. Meine bisherigen Resultate sind folgende:

Bei der Hydrolyse des chondroitinschwefelsauren Kupfers mit verdünnten Säuren erhält man leicht Chondrosinkupfer, von dem einige basische Verbindungen im Folgenden beschrieben werden.

Dieses Chondrosinkupfer, resp. das daraus erhaltene Chondrosin geben sehr leicht im Gegensatze zu den Beobachtungen von Orgler und Neuberg mit Phloroglucin und Salzsäure, sowie mit Orcin und Salzsäure mit und ohne Eisenchlorid die charakteristischen Farbenreactionen, welche auf einen Glycuronsäurecomplex in der Verbindung verweisen, da ja das Vorliegen einer Pentose im Chondrosin aus anderen Gründen nicht anzunehmen ist. Es erfordert nur ein vorhergehendes Kochen mit 20-procentiger Schwefelsäure, um sicher die Reaction zu erhalten, aber auch direct bekommt man mit dem Chondrosin die Reactionen. Das Versagen der Reaction bei den Untersuchungen von Orgler und Neuberg ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese beiden Forscher die Chondroitinschwefelsäure direct oder nach dem Aufkochen mit Mineralsäuren oder nach einstündigem Erhitzen mit einprocentiger Schwefelsäure auf 125° im Autoclaven angestellt haben, wobei wahrscheinlich die Chondroitinschwefelsäure noch nicht genügend bis zum Chondrosin bzw. bis zur Aufspaltung des Chondrosins zerlegt war. Aus dem Chondrosin ist es mir gelungen, in zwei von vielen Versuchen eine Säure darzustellen, die ich als Aminoglycuronsäure anspreche, da ihre Elementaranalyse zu der Formel $C_6H_{11}O_6N$ führt. Diese Substanz zeigt, ähnlich wie die Glycuronsäure selbst, keine Neigung zur Bildung von unlöslichen Osa- zonen, und wie diese ist sie einem weiteren Zerfall leicht zugänglich.

Sie giebt die charakteristischen Reactionen mit Phloroglucin und Orcin und steht sicher in Beziehung zu der von

Orgler und Neuberg gefundenen Hexosaminsäure, welche um zwei Wasserstoffatome reicher ist. Die Aminoglycuronsäure reducirt sehr leicht Fehling'sche Lösung. Es ist nun naheliegend anzunehmen, dass dem Chondrosin eine Aminoglycuronsäure und ein Complex $C_6H_{12}O_6$ zu Grunde liegen, welch letzterer wohl einem sehr labilen Zucker angehört, der sich leichter als die Aminoglycuronsäure unter der Einwirkung von spaltenden Agentien zersetzt. Meine Untersuchungen zeigen, dass wohl die Annahme von Schmiedeberg, Glycuronsäure und Glycosamin seien die dem Chondrosin zu Grunde liegenden Substanzen, im Grossen und Ganzen nicht richtig ist, dass vielmehr die Aminogruppe der Glycuronsäurecomponente und nicht der Zuckercomponente angehört. Während Aminokohlehydrate als die Bestandtheile der Organismen schon des Oefteren gefunden wurden, ich erinnere an das Glycosamin (Ledderhose) und die Aminopentose (Offer), sind Kohlehydratsäuren, die stickstoffhaltig sind, noch nicht gefunden worden, so dass die Aminoglycuronsäure sowohl chemisch als physiologisch einen neuen Typus darstellt.

Interessante Resultate brachte die Einwirkung von 70-procentiger Schwefelsäure sowohl in der Kälte, als auch bei mässiger Wärme auf chondroitinschwefelsaures Kupfer. In der Kälte wurde eine Verbindung $C_{16}H_{23}NO_{13}$ erhalten, die als Chondroitin anzusprechen ist, aus dem ein Acetyl abgespalten wurde. Diese Substanz reducirt nicht. Bei mässiger Wärme und längerer Dauer des Versuches erhielt ich eine Substanz, die stark reducirte und bei der Elementaranalyse der Formel $C_{10}H_{19}NO_9$ entsprach, die also als ein Chondrosin aufzufassen ist, aus dem die Gruppe $C_2H_2O_3$ abgesprengt wurde, welche vielleicht als Doppelradical der Ameisensäure aufzufassen ist.

Experimenteller Theil.

Einwirkung von kalter 70-procentiger Schwefelsäure auf chondroitinschwefelsaures Kupfer.

Nicht reducirende Substanz aus Chondroitin.

10 g des Kupfersalzes der Chondroitinschwefelsäure wurden mit 100 ccm 70-procentiger Schwefelsäure übergossen und gerührt. Nach 48 Stunden, als die Flüssigkeit schon stark reducirt, wurde mit Baryumcarbonat neutralisirt. Die Barytsalze wurden mehrfach mit siedendem Wasser ausgewaschen, die vereinigten Filtrate mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit, der Rest der Schwefelsäure durch Schütteln mit wenig Baryumcarbonat entfernt, filtrirt und im Vacuum bis auf etwa 10 ccm eingeengt. Die Flüssigkeit wurde mit der dreifachen Menge 96-procentigen Alkohols gefällt, der zähklebrige Niederschlag in wenig Wasser gelöst, filtrirt, mit wenig Alkohol bis zum Auftreten einer Trübung versetzt, filtrirt und mit viel Alkohol wieder gefällt. Die alkoholische Fällung war barythaltig, sie wurde vorsichtig mit verdünnter Schwefelsäure genau von Baryt befreit und im Vacuum eingeengt. Die Substanz war in absolutem Alkohol löslich und wurde aus diesem durch Aether gefällt.

Sie war in Wasser sehr leicht löslich, reagirte sauer, war barytfrei und schwefelsäurefrei und reducirt nur nach langem Kochen spurenweise. Nach kurzem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure gab sie starke Reduction. Sie gab weder mit neutralem noch basischem Bleiacetat Fällung.

Die Elementaranalyse der im absoluten Vacuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab:

0,1396 g gaben 0,2015 CO₂ und 0,0734 H₂O.

0,1306 g „ 3,53 ccm Stickgas bei 17° und 761 mm Druck.

	Berechnet für	Gefunden
	$C_{16}H_{29}NO_{16} = C_{16}H_{23}NO_{13} + 3 H_2O$	
C	39,10	39,36
H	5,90	5,88
N	2,85	3,19

Die Substanz ist also unter der Annahme der Richtigkeit der Schmiedeberg'schen Formel als Chondroitin aufzufassen, aus welchem eine Acetylgruppe abgespalten wurde, also als *einfach entacetylrtes Chondroitin*, $C_{16}H_{23}NO_{18}$.

Baryumsalz des einfach entacetylirten Chondroitins.

7 g chondroitinschwefelsaures Kupfer wurden mit 75-procentiger Schwefelsäure verrieben, zwei Stunden in der Kälte stehen gelassen und vier Stunden bei etwa 40° gehalten, hierauf mit viel absolutem Alkohol versetzt, von Gyps abfiltrirt, das Filtrat mit Baryumcarbonat gesättigt und filtrirt, im Vacuum eingeeengt, wiederum filtrirt und mit der fünffachen Menge 96-procentigen Alkohols gefällt. Es fällt ein weisser Niederschlag, der noch zweimal in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt wurde. (Fraction I). Das Filtrat wurde auf 5 cem eingeeengt, es giebt mit Methylalkohol keinen Niederschlag, aber Aether bewirkt in der methylalkoholischen Lösung eine Fällung (Fraction II). Es wird davon abfiltrirt, die ätherische methylalkoholische Flüssigkeit eingeeengt, mit Aether fällt eine klebrige Substanz (Fraction III), welche im Vacuum ein weisses Pulver giebt.

Die Substanz Fraction III ist ein Barytsalz, welches bei der Analyse folgende Werthe gab:

0,2354 g, vacuumtrocken, gaben 0,2521 CO_2 und 0,0981 H_2O .

0,2161 g, vacuumtrocken, gaben 4,3 cem Stickgas bei 22° und 747 mm Druck.

0,2595 g, vacuumtrocken, gaben mit Schwefelsäure abgeraucht 0,0896 g $BaSO_4$.

	Berechnet für	Gefunden
$C_{16}H_{31}O_{18}NBa$	$= C_{16}H_{21}O_{13}NBa + 5 H_2O$	
C	28,99	29,21
H	4,98	4,63
N	2,11	2,21
Ba	20,74	20,69

Basische Kupfersalze des Chondroitins.

Diese beiden Kupfersalze wurden erhalten bei achtstündiger Hydrolyse von chondroitinschwefelsaurem Kupfer mit zehnpcentiger Schwefelsäure, Sättigung des Reactionsproductes mit Baryumcarbonat, Einengen des Filtrates im Vacuum und Fällern mit Methylalkohol. Sie wurden durch fractionirte Fällung mit absolutem Methylalkohol, wiederholtes Lösen in wenig Wasser und Fällern mit absolutem Methylalkohol gereinigt. Die Substanzen waren, vacuumtrocken, lichtblaue, sehr luftbeständige Körper, deren Kupfergehalt aber inconstant war. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sie ein Gemenge des basischen Kupfersalzes mit gelöstem Kupferoxydhydrat waren. Während die Verhältnisszahlen zwischen Kohlenstoff und Stickstoff in beiden Verbindungen genau $C_{12} : N$ sind, variirt der Kupfergehalt; es ist kein Zweifel, dass es sich um basische Verbindungen des reinen Chondrosins handelt.

Die im absoluten Vacuum getrocknete Substanz aus der ersten Darstellung ergab:

0,1741 g gaben 0,2085 CO_2 und 0,0781 H_2O .

0,2000 g „ 5,3 ccm Stickgas bei 14° und 755 mm Druck.

0,2000 g hinterliessen 0,0480 CuO als Rückstand im Platinschiffchen.

	Gefunden
C	32,65
H	4,9
N	3,1
Asche: CuO	19,1, daraus
Cu	15,26.

Eine Substanz aus einer zweiten Darstellung ergab:

0,1856 g gaben 0,1112 CO_2 und 0,05011 H_2O .

0,1752 g „ 2,38 ccm Stickgas bei 14° und 758 mm Druck.

	Gefunden
C	16,40
H	3,00
N	1,60
Cu	39,80 (aus dem Schiffchenrückstande berechnet)

Reducirende Substanz aus Chondroitinschwefelsäure durch Spaltung mit concentrirter Schwefelsäure gewonnen.

Wie bei der Darstellung des entacetylrten Chondroitins wurde chondroitinschwefelsaures Kupfer vier Tage lang bei Zimmertemperatur mit 70-procentiger Schwefelsäure behandelt und das Product in beschriebener Weise verarbeitet. Auch hier resultirte eine in absolutem Alkohol lösliche und aus dieser Lösung durch Aether fällbare Substanz. Diese reducirte im Gegensatze zu der vorher beschriebenen sehr intensiv Fehling'sche Lösung, gab aber mit keinem Phenylhydrazinderivat krystallisirende oder unlösliche Verbindungen.

Die Elementaranalyse der im absoluten Vacuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab:

0,1848 g gaben 0,2733 CO_2 und 0,1039 H_2O .

0,1612 g „ 6,29 ccm Stickgas bei 12,6° und 761,5 mm Druck.

	Berechnet für	Gefunden
	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_9$	
C	40,40	40,33
H	6,39	6,29
N	4,71	4,68

Die Substanz lässt sich als Spaltungsproduct des Chondrosins, $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_{11}$, auffassen, welches nach Abspaltung einer Gruppe $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ in $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_9$ übergeht. Diese Gruppe $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ dürfte am ehesten als aus zwei Radicalen der Ameisensäure bestehend aufgefasst werden.

Aminoglycuronsäure?

Chondroitinschwefelsaures Kupfer wurde mit 20-procentiger Schwefelsäure im Wasserstoffstrome 12 Stunden lang hydrolysirt, die Lösung mit Bleiacetat und Bleicarbonat gesättigt, filtrirt, concentrirt, das Blei und Kupfer mit Schwefelwasserstoff entfernt, im Vacuum eingeeengt und mit Methylalkohol (ab-

solutum) gefällt, wieder gelöst und gefällt und mit Aether gewaschen. Aus der methylalkoholischen Mutterlauge wurde noch eine zweite Fraction nach vorsichtigem Aetherzusatz erhalten.

Die Substanz Fraction I, ein weisses, trocknes Pulver gab nach dem Trocknen im absoluten Vacuum über Schwefelsäure bei der Elementaranalyse folgende Zahlen.

Die Substanz enthielt 19,2 pC. feuerbeständige Asche, da das Ausgangsmaterial kalkhaltig war.

0,1903 g aschehaltige Substanz gaben 0,2440 CO₂, oder 34,96 pC. C und 0,0826 H₂O, oder 4,82 pC. H.

0,1039 g aschehaltige Substanz gaben 5,2 ccm Stickgas bei 14° und 738 mm Druck oder 6,48 pC. N.

Berechnet für
aschefreie Substanz

C	37,87
H	5,22
N	7,02

Die Substanz Fraction II gab bei der Elementaranalyse folgende Zahlen:

Die Substanz enthielt 10,75 pC. feuerbeständige Asche.

0,1495 g gaben 0,1967 CO₂, oder 35,81 pC. C und 0,0763 H₂O oder 5,66 pC. H.

0,1060 g gaben 6,6 ccm Stickgas bei 13° und 746 mm Druck, oder 7,22 pC. N.

Berechnet für
aschefreie Substanz

C	37,42
H	5,91
N	7,54

Berechnet für		Gefunden	
Aminoglycuronsäure, C ₆ H ₁₁ NO ₆		I. Fraction	II. Fraction
C	37,3	37,87	37,42
H	5,7	5,22	5,91
N	7,2	7,02	7,22

Die Substanz giebt sehr leicht und schon in kleinen Mengen die Orcinreaction. Beim Kochen mit concentrirter Salzsäure und Orcin färbt sie sich violett und wird auf Zusatz von Eisenchlorid grün. Die grüne Farbe lässt sich mit Amylalkohol extrahiren.

Die vorliegende Substanz war anscheinend die mit etwas Gyps verunreinigte freie Säure.