

Ueber Chondroitinschwefelsäure und das Vorkommen einer Oxyaminosäure im Knorpel I.

Von

A. Orgler und C. Neuberg.

Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 16. Februar 1903.)

Carl Th. Mörner's¹⁾ Entdeckung der Chondroitinsäure im Jahre 1889 oder, wie sie später von Schmiedeberg umbenannt wurde, der Chondroitinschwefelsäure ist der Ausgangspunkt einer Reihe biologisch interessanter Befunde geworden. Nachdem schon Mörner ihren Charakter als Aetherschwefelsäure, sie also als Vertreter jener für den Haushalt des Organismus so wichtigen Körperklasse erkannt hatte, konnte ihr Entdecker bald ihr fast universelles Vorkommen zeigen. Neben der ursprünglichen Fundstätte, dem Trachealknorpel des Rindes, enthalten nicht nur alle hyalinen, sondern auch elastischen, sowie Bindegewebs-Knorpel Chondroitinschwefelsäure²⁾ Sie ist auch in der Knochensubstanz,³⁾ besonders reichlich in der der Fische,⁴⁾ sowie in den Wandungen der Blutgefäße,²⁾ zugegen: ebenso wenig hat sie Mörner in pathologischen Knorpelbildungen vermisst. Zugleich mit den gewöhnlichen Aetherschwefelsäuren der Phenol- und Indoxyl-Gruppe findet sich die Chondroitinschwefelsäure nach K. A. Mörner's⁵⁾ wichtigen Untersuchungen im normalen

1) C. Th. Mörner, Skandinav. Arch. für Physiol. Bd. 1, S. 210, 1889.

2) C. Th. Mörner, Diese Zeitschr., Bd. XX, S. 360, 1894.

3) C. Th. Mörner, Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 317, 1897.

4) J. Lömsberg, Upsala Säkareförenings förhandl., Bd. 24, S. 495 und Bd. 25, S. 249, 1889.

5) K. A. H. Mörner, Skandinav. Arch. f. Physiol., Bd. 6, S. 332, 1895.

Harn. Auch als Bestandtheil ganz anderer Gebilde findet sich die Chondroitinschwefelsäure. So konnte sie von Oddi¹⁾ in der Amyloidsubstanz der Leber nachgewiesen werden, und nach Krawkow²⁾ lässt sie sich ganz allgemein aus amyloid-entarteten Organen sowie aus der Schleimhaut der Schweinemagen und dem Nackenband isoliren.

Auf Chondroitinschwefelsäure oder ihr sehr nahe stehende Verbindungen sind ferner augenscheinlich die Angaben einiger Autoren zu beziehen, die in den Mucinen auf sie gefahndet haben. So soll nach C. U. Zanetti³⁾ ein Teil des Schwefels im Ovomucoid in esterartiger Bindung zugegen sein. Nach P. A. Levene⁴⁾ soll sich im Tendomucin eine Chondroitinschwefelsäure finden, die von der gewöhnlichen vielleicht durch einen höheren Gehalt an Glucosamin verschieden ist. Ebenso oder ähnlich soll sich nach diesem Autor Submaxillarismucin und das eines Carcinoms verhalten. Erwähnt seien noch Angaben von Panzer,⁵⁾ sowie von Leathes⁶⁾ über die Natur des Paramucins. Beide Autoren fanden in diesem Material eine Aetherschwefelsäure, die nach Leathes ein Reductionsproduct der Chondroitinschwefelsäure darstellen soll. Ganz neuerdings haben Hawk und Giess⁷⁾ Untersuchungen über das Mucoïd der Knochensubstanz mitgetheilt, nach denen auch in diesem Osseomucoid genannten Körper eine ähnliche Substanz zugegen zu sein scheint.

Ueberblickt man dieses reichhaltige Material der Litteratur, so erhebt sich unwillkürlich die Frage, ob alle diese mit dem Namen Chondroitinschwefelsäure belegten Verbindungen überhaupt identisch sind; denn eigentlich ist nur eine dieser zahlreichen Verbindungen, die aus hyaliner Knorpelsubstanz

1) R. Oddi, Arch. f. exp. Path., Bd. 33, S. 376, 1894.

2) P. X. Krawkow, ebendas., Bd. 40, S. 195, 1897.

3) Zanetti, Ann. di Chim. et Farmac., Bd. 12, 1897. Ganz neuerdings theilt L. Langstein (Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. III, 1903) mit, dass er diese Angaben Zanetti's nicht bestätigen konnte.

4) Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 395, 1900.

5) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 363, 1899.

6) Arch. f. exp. Pathol., Bd. 43, S. 245, 1899.

7) American Journ. of Physiol., Bd. 5, S. 387, 1902.

dargestellt ist, Gegenstand eingehender Erforschung gewesen. Dieselben verdanken wir O. Schmiedeberg.¹⁾ Nachdem dieser Autor in der Nasenscheidewand des Schweins ein geeignetes Material für die Darstellung der Chondroitinschwefelsäure in grösseren Mengen gefunden hatte, suchte er in mühevollen, über ein Jahrzehnt ausgedehnten Untersuchungen die Natur der Knorpelsubstanz, insbesondere die Constitution der Kohlehydratgruppe zu ergründen, die schon früher in der Knorpelsubstanz aufgefunden und als deren Träger schon von C. Th. Mörner der Complex der Chondroitinschwefelsäure erkannt war. Die Frage nach der Natur dieses Complexes, der bei Behandlung von Knorpeln mit Mineralsäuren entsteht, hatte seit einem halben Jahrhundert die wechselvollste Beantwortung erfahren, und gross ist die Reihe der Forscher, die sich mit dieser Substanz bis zu den Tagen Mörner's und Schmiedeberg's beschäftigt haben. Es mag genügen, an die Namen Bödicker (1854), G. Fischer (1861), Meissner (1862), de Bary (1866), v. Mering (1872), Morochowetz (1876), Petri (1879), Krukenberg (1883), Landwehr (1886) zu erinnern. Erst Schmiedeberg blieb es vorbehalten, die Kohlehydratgruppe frei von begleitenden Proteinkörpern darzustellen. Er fand, dass im Molekül der Chondroitinschwefelsäure Essigsäure vorhanden ist, die schon bei einem anderen natürlich vorkommenden N-haltigen Kohlehydrat, dem Chitin, von Ledderhose beobachtet war und seitdem von Friedrich Müller²⁾ und seinen Schülern als ein integrierender Bestandtheil der Mucine erkannt ist. Weiter gelang es Schmiedeberg, durch den Abbau der Chondroitinschwefelsäure unzweifelhaft darzuthun, dass ihr Stickstoffgehalt dem Kohlehydratcomplex zugehört, und so die selbst in diesem Punkte widersprechenden Angaben der früheren Autoren zu klären. Weniger überzeugend ist die Beweisführung Schmiedeberg's bezüglich der Constitution, die er der Chondroitinschwefelsäure und ihren Spaltungsproducten zuschreibt. Aus der bei der Verdauung der Knorpel-

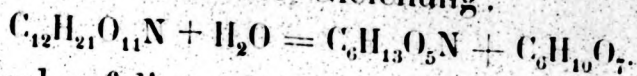
1) O. Schmiedeberg, Ueber d. chem. Zusammensetzung d. Knorpels. Arch. f. exp. Pathol., Bd. 28, S. 355—404, 1891.

2) Fr. Müller, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 42, S. 492, 1901.

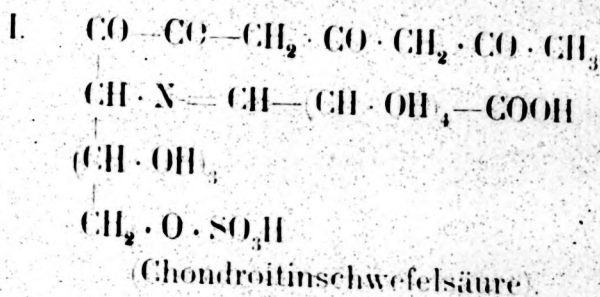
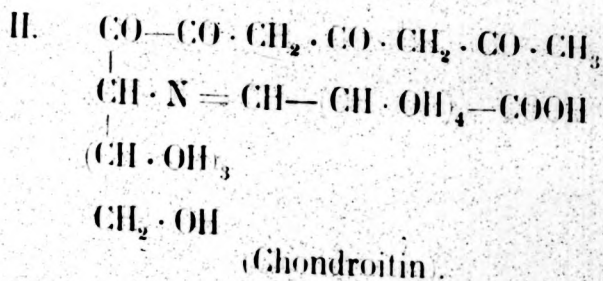
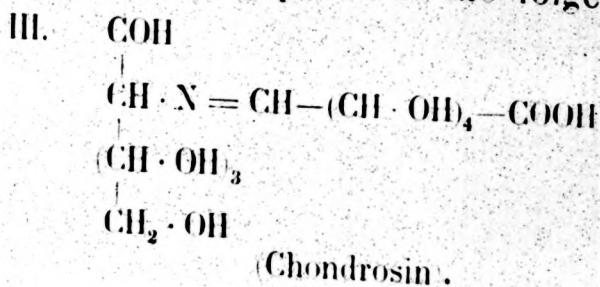
substanz entstehenden Lösung von Glutin- resp. Peptochondrin isolierte Schmiedeberg die Chondroitinschwefelsäure durch Fällung mit Kupferacetat und Kali als basisches Kupferkaliumsalz. Aus den Analysen amorpher und keineswegs constant zusammengesetzter Salze leitet er für die freie Säure (I) die Formel $C_{18}H_{27}O_{17}NS$ ab. Ihrem Charakter als Aetherschwefelsäure entsprechend, spaltete diese nicht reducirende Substanz bei geeigneter Behandlung mit Mineralsäure die Elemente der Schwefelsäure ab und ging in eine gleichfalls nicht reducirende und amorphe Säure (II) der Formel $C_{18}H_{27}O_{14}N$, das Chondroitin, über. Letzteres hat den ausgesprochenen Charakter eines Gummis und erlangt demgemäss bei Behandlung mit verdünnten Mineralsäuren Reduktionsvermögen gegen Fehling'sche Lösung. Zur Darstellung dieses reducirenden Productes kann man auch von der Chondroitinschwefelsäure selbst ausgehen und erhält in beiden Fällen bei Behandlung mit Salpetersäure das gleichfalls amorphe Sulfat einer neuen sauer reagirenden und zugleich reducirenden Substanz, das Chondrosinsulfat $(C_{12}H_{21}O_{11}N)_2 \cdot H_2SO_4$. Aus letzterem, das nach dem Eintrocknen als farblose glasige Schicht zurückbleibt und niemals auch nur eine Andeutung von Krystallisation zeigt, entsteht bei der Zerlegung mit Bleioxyd u. s. w. eine gummiartige Masse, das freie Chondrosin (III), für das Schmiedeberg aus der Analyse des erwähnten schwefelsauren Salzes die Formel $C_{12}H_{21}O_{11}N$ ableitete. Die weitere Aufspaltung des Chondrosins hat Schmiedeberg durch Baryt bewirkt, indem er das Sulfat mit reichlichen Mengen heissgesättigten Barytwassers nach Filtration von schwefelsaurem Baryt auf 40—50° erwärmte. Dabei schieden sich orangegelbe Flocken einer Baryumverbindung vom äusseren Habitus des basischen Baryumglucuronats aus, eine Reaction, die nach Schmiedeberg allein für den Nachweis von Glucuronsäure unter den Spaltungsproducten des Chondrosins ausreichend sein soll, obgleich der als einziger analytische Beleg mitgetheilte Baryumgehalt 27,81% o., statt der theoretisch erforderlichen 26,19% o. beträgt. Den Mehrgehalt an Baryum bezieht Schmiedeberg auf die Gegenwart von kohlenstoffärmeren und baryumreicheren Säuren.

die beim Kochen von Chondrosin mit Baryt bis zum Verschwinden des Reductionsvermögens entstehen. Die letzteren, drei an Zahl, sind nicht rein erhalten, sondern alle in Form ihrer amorphen Baryumsalze analysirt, die mehr oder minder erhebliche Abweichungen von den Formeln $C_5H_8O_7Ba$, $C_5H_6O_7Ba$ und $(C_4H_7O_5)_2Ba$ zeigten.

Ein Baryumsalz von der Zusammensetzung $C_5H_6O_7Ba$ wurde nun neben anderen Baryumsalzen auch unter den Zersetzungsproducten von Glucuronsäure mit Baryt gefunden; ebenso wurde ein solches von der angenäherten Zusammensetzung $(C_4H_7O_5)_2Ba$ aus Glucosamin-Chlorhydrat bei Behandlung mit Baryt gewonnen. Auf Grund dieser Ergebnisse kam Schmiedeberg dann zu dem Schlusse, dass Chondrosin bei der Barytbehandlung primär in gleiche Moleküle Glucuronsäure und Glucosamin zerfalle nach der Gleichung:



Aufbauend auf diesen Resultaten reconstruirte Schmiedeberg unter Berücksichtigung aller vorerwähnten Thatsachen, insbesondere der Reductionsverhältnisse der einzelnen Substanzen und ihrer analytischen Daten für die Chondroitinschwefelsäure und ihrer Spaltungsproducte die folgenden Formeln:



Wenn man bedenkt, dass diese mühevollc Untersuchung Schmiedeberg's in der vorklassischen Zeit der Kohlehydratchemie angestellt und namentlich ohne alle die Hilfsmittel ausgeführt ist, die Emil Fischer nachmals geschaffen hat, so kann es nicht Wunder nehmen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mehr mit unseren heutigen Erfahrungen auf diesem Gebiete in Einklang zu bringen sind. Es hat denn auch in jüngster Zeit nicht an Bedenken gegen die von Schmiedeberg aufgestellte Constitutionsformel gefehlt. Zuerst war es Friedrich Müller,¹⁾ der Zweifel geltend machte, da es seinem Schüler Stähelin nicht gelungen war, mit sehr viel besserer Methodik das Glucosamin unter den Zersetzungsproducten der Chondroitinschwefelsäure aufzulinden. Dann hat sich Steudel²⁾ gegen die Beweiskraft der Schmiedeberg'schen Befunde ausgesprochen. Für uns war zur Beschäftigung mit der Chondroitinschwefelsäure eine Untersuchung von Neuberg und Heymann³⁾ über Pseudomucin die Veranlassung. Diese wiesen im hiesigen Laboratorium nach, dass ein mit der Chondroitinschwefelsäure für verwandt gehaltener Bestandtheil der Ovarialcysten, die erwähnte, von Schmiedeberg's Schüler Leathes beschriebene Anhydroglucosamingulose, die er als reducirtes Chondrosin aufusste (Paramucosin), nicht existirte. Hierzu kamen einige Bedenken rein chemischer Natur, die sich bei Betrachtung der Schmiedeberg'schen Formeln ergaben, selbst wenn man die Beweiskraft der ausschliesslich aus amorphen Substanzen gewonnenen Analysendaten nicht in Zweifel ziehen will. Chondroitin, wie Chondroitinschwefelsäure erscheinen nach Schmiedeberg's Formeln als Tetraketone: nach allem, was wir über Polyketone⁴⁾ wissen, sind dieselben ausserordentlich empfindliche und zersetzliche Substanzen von energischem Reduktionsvermögen, kurz von Eigenschaften, die der Beständig-

1) Fr. Müller, Zeitschr. f. Biol., Bd. 42, S. 534, 1901.

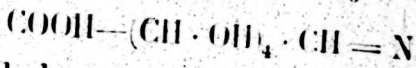
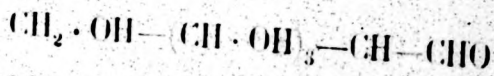
2) H. Steudel, Diese Zeitschr., Bd. XXXIV, S. 359, 1902.

3) C. Neuberg u. F. Heymann, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. II, S. 201, 1902.

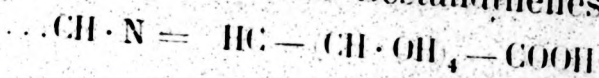
4) F. Sachs u. H. Barschall, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 34, S. 3047 (1901).

keit der genannten Knorpelsubstanz und ihrer völligen Indifferenz gegen Fehling'sche Lösung gerade entgegengesetzt sind.

Vom Chondrosin



hebt Schmiedeberg ausdrücklich hervor;¹⁾ es wird selbst durch concentrirte Salpetersäure in der Wärme nur schwer angegriffen, ja man kann das Sulfat sogar mit Salpetersäure auf dem Wasserbade zur Trockne eindampfen, ohne dass es seine Eigenschaft, Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduciren, einbüsst. Nach allen Erfahrungen in der Kohlehydratreihe lässt sich ein solches Verhalten nicht mit der Gegenwart einer Aldehydgruppe in Einklang bringen, die Schmiedeberg seiner Substanz zuschreibt; denn alle Aldehydzucker werden, je nach der Intensität der Einwirkung von Salpetersäure, durch Oxydation der Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe zu Mono- oder sogar meist weiter zu Dicarbonsäuren oxydirt. Ketosen werden gleichfalls durch jenes Reagens energisch angegriffen, und die bekannten stickstoffhaltigen Substanzen der Kohlehydratreihe verlieren bei derartiger Behandlung sogar ihre Aminogruppe. Ferner erscheint eine Resistenz des Chondrosins gegen Salpetersäure auch aus dem Grunde unwahrscheinlich, dass die angeblichen Componenten derselben, Glucosamin und Glucuronsäure, energisch von Salpetersäure angegriffen werden, wobei letztere in d-Zuckersäure²⁾ (Thierfelder), erstere in Iso-, resp. in Norisozuckersäure (Tiemann)³⁾ übergeht. Ferner betont Schmiedeberg, dass sich Chondrosin entgegen der durch die Formel ausgedrückten Disaccharidnatur durch Säuren nicht in seine Componenten spalten lasse, und dass dieses Verhalten dadurch bedingt sei, dass die Aldehydgruppe der Glucuronsäure in die Aminogruppe des anderen Bestandtheiles

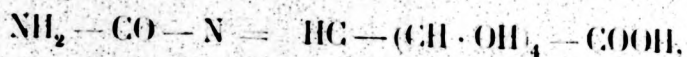


1) l. c. S. 380.

2) H. Thierfelder, Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 19, S. 3148, 1886.

3) F. Tiemann, Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 17, S. 246, 1884 u. Bd. 27, S. 118, 1894.

eingreife. Nun haben kürzlich C. Neuberg und W. Neimann eine nach der Synthese unzweifelhaft diesem Typus angehörige Glucuronsäureverbindung, die Ureidoglucuronsäure¹⁾



dargestellt, die gerade durch erhebliche Säureempfindlichkeit ausgezeichnet ist und durch Hydrolyse glatt in die Componenten zerfällt. Zu diesen Einwänden gegen die Schmiedeberg'schen Formeln tritt noch als ein weiteres Argument die ausgeprägte colloidale Natur aller der erwähnten Substanzen, die ebenso wie der Mangel jeder Krystallisationsfähigkeit nicht im Einklang mit den aus den Formeln berechneten relativ niederen Molekulargewichten stehen.

Unsere eigenen Untersuchungen haben wir daher mit der Ermittlung des Molekulargewichtes für das Chondrosin begonnen, da dieses offenbar das niedrigste Abbauproduct der Chondroitinschwefelsäure ist, das die stickstoffhaltige Kohlehydratgruppe noch enthält. Die Darstellung der Chondroitinschwefelsäure haben wir genau nach Schmiedeberg's Angaben vorgenommen und bei Verarbeitung von 600 Stück Nasenscheidewänden des Schweins nicht unerhebliche Mengen erhalten. Zur Darstellung der Chondroitinschwefelsäure und weiterhin des Chondrosins bedienten wir uns des chondroitinschwefelsauren Bleis, das man durch Fällen der ammoniakalischen Lösung des Kupferkaliumsalzes mit Bleiessig erhält. Durch besondere Versuche stellten wir fest, dass man dasselbe nach dem Auswaschen völlig frei von Kali, aber häufig mit etwas Kupfer verunreinigt und in diesem Falle ganz schwach grünstichig erhält. Durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff, anfangs in der Kälte, zum Schluss auf dem Wasserbade, werden beide Metalle entfernt und es resultirt eine wasserklare Lösung der freien Säure, die wir nach Schmiedeberg's Angaben auf Chondrosinsulfat verarbeitet haben. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein aus den als charakteristisch betrachteten

¹⁾ Ueber dieselbe wird demnächst berichtet werden: vergl. Vortrag auf der Karlsbader Naturforschervers. Sept. 1902.

kugeligen Körnchen bestehendes Präparat, für das wir die spezifische Drehung

$$[\alpha]_{D_{17}} = + 38,44^{\circ}$$

$$(\alpha = 1,75^{\circ}, C = 4,5522, l = 1)$$

fanden.

Daraus berechnet sich für freies Chondrosin der Werth

$$[\alpha]_D = + 43,74^{\circ}$$

während Schmiedeberg unter ähnlichen Bedingungen den Werth

$$[\alpha]_D = + 42,0^{\circ}$$

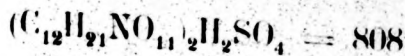
ermittelt hat. Sowohl nach der Methode der Siedepunktserhöhung sowie der Gefrierpunktserniedrigung fanden wir Zahlen, die ein erheblich höheres Molekulargewicht anzeigen, als es der Formel von Schmiedeberg entspricht. Das ebullioskopische Verfahren ergab: 2022

$$(\Delta = 0,02; p = 7,7774)$$

das kryoskopische den Werth: 1633

$$(\Delta_1 = 0,09; p = 7,7774)$$

Wie man sieht, übertreffen die gefundenen Werthe den berechneten



um das Doppelte bis Dreifache. Zu diesen Zahlen ist allerdings zu bemerken, dass das Molekulargewicht möglicher Weise etwas geringer ist, da die benutzte Verbindung als Salz dissociirt ist; ausserdem sind diese Zahlen bei der Kleinheit der Siedepunktserhöhung resp. der Gefrierpunktserniedrigung nur als Näherungswerthe zu betrachten.

Sind somit die Resultate der physikalischen Bestimmungsmethoden immerhin nicht dazu angethan, die Schmiedeberg'schen Formeln zu stützen, so haben die rein chemischen Versuche zu Ergebnissen geführt, die mit denselben nicht mehr in Einklang zu bringen sind.

Von den supponirten, zur Reihe der Kohlehydrate gehörigen Spaltungsproducten der Chondroitinschwefelsäure, der Glucuronsäure und dem Glucosamin, besitzt unzweifelhaft das erstere das grössere Interesse. Denn durch zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre sind wir darüber unterrichtet, dass der Aminozucker zu den weit verbreitetsten Substanzen in

der Natur zählt, während wir, von pathologischen oder künstlich geschaffenen Verhältnissen abgesehen, für Glucuronsäure bisher nur ganz vereinzelte Stätten normalen Vorkommens mit Sicherheit kennen, den menschlichen Harn¹⁾ und das Blut.²⁾ Bei dem grossen Interesse, das gerade im Augenblick der Glucuronsäure von den verschiedensten Seiten entgegengebracht wird, verdient die von Schmiedeberg angenommene Beteiligung der Glucuronsäure am Aufbau der Chondroitinschwefelsäure eine besondere Beachtung, da dieser Autor bekanntlich den Knorpel als Reservoir dieser physiologisch so hervorragend wichtigen Substanz und als Bildungsstätte für die sogenannten gepaarten Glucuronsäuren betrachtet, aus der sie nach Bedarf an den Organismus abgegeben werden sollen. Aus diesem Grunde haben wir uns zunächst dem Nachweis der Glucuronsäure unter den Spaltungsproducten der Chondroitinschwefelsäure zugewandt, für den gerade in letzter Zeit eine Reihe guter Methoden gefunden sind. Zuerst haben wir rein qualitativ mit der ausgezeichnet scharfen Tollens'schen³⁾ Orcin- und Phloroglucinprobe geprüft. Dabei zeigte die Chondroitinschwefelsäure ein eigenthümliches Verhalten. Das rohe Chondroitinschwefelsäurekupferkali, das noch schwache Biuretreaction zeigt, gibt schwach die bekannten Farbenreactionen, dieselben verschwinden aber nach Reinigung der Substanz durch Umfällen in der von Schmiedeberg angegebenen Weise.⁴⁾ Auch nach Zusatz von Eisenchlorid, das nach Bial⁵⁾ die Schärfe

1) P. Mayer und C. Neuberg. Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 256 (1900).

2) Paul Mayer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 518 (1901); R. Lépine, C. r. de l'Acad. des sc., Bd. 133, S. 138 (1901) und Bd. 134, S. 398 (1902).

3) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 22, S. 1046 (1889); Bd. 29, S. 1202 (1896).

4) Dem rohen Product ist offenbar eine geringe Menge eines pentoschaltigen Nucleoproteids beigemengt; aus diesem stammt vielleicht das Furfurol, das Friedrich Müller (Zeitschr. f. Biolog., Bd. 42, S. 496, 1901) beim Kochen von Knorpel mit HCl erhielt, während es aus reiner Chondroitinschwefelsäure (s. u.) nicht entsteht.

5) M. Bial, Deutsche medicin. Wochenschrift, 1902, Nr. 15.

der Probe noch erheblich steigert, fällt die Orcinreaction absolut negativ aus, und zwar dieses mit der Substanz 1. direct, 2. nach dem Aufkochen mit Mineralsäuren und 3. nach einstündigem Erhitzen im Autoclaven mit 1^o iger Schwefelsäure auf 125°. Durch einen besonderen Versuch. haben wir uns überzeugt, dass die wässerige Lösung eines äquimolekularen Gemisches von krystallisirtem Glucuronsäurelacton und freiem Glucosamin die Orcinreaction in ausgezeichneter Weise gibt, und dass weder Zusatz von Essigsäure noch Schwefelsäure in der von Schmiedeberg's Formel für Chondrosinsulfat geforderten Menge ihren Eintritt stört. Sodann haben wir als zweite Probe die gleichfalls von Tollens¹⁾ herrührende Methode der Salzsäuredestillation angewandt, bei der freie wie gepaarte Glucuronsäuren unter Bildung von Furfurol zerfallen. Letzteres haben wir bei zweistündiger Destillation von 5 g Chondroitinschwefelsäure mit 500 cem Salzsäure im Destillat mit Anilinderivat nicht nachweisen können, und ein Versuch, das Phloroglucid darzustellen, lieferte nicht einmal solche Spuren des Condensationsproductes, wie sie sogar aus der Mehrzahl der Hexosen und Disaccharide entstehen. Obgleich bereits hierdurch die Gegenwart von Glucuronsäure höchst unwahrscheinlich gemacht war, haben wir nicht unterlassen, mit zwei speciellen Methoden auf Glucuronsäure zu fahnden, die zu wohldefinirten Derivaten dieser Säure führen. Zu diesem Zwecke wurde eine Lösung von ca. 20 g Chondrosinsulfat und 200 cem Wasser mit 2 g concentrirter Schwefelsäure zwei Stunden im Autoclaven auf 125° erhitzt. Von der resultirenden Flüssigkeit diente die eine Hälfte nach Neutralisation mit Soda zur Verarbeitung auf die p-Bromphenylhydrazinverbindung²⁾ der Glucuronsäure, die andere wurde nach genauer Ausfällung der Schwefelsäure mit Barytwasser nach dem Oxydationsverfahren von Neuberg und Wolff³⁾ behandelt, was speciell einen be-

1) Tollens und seine Schüler. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 24, S. 3575.

2) C. Neuberg. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 32, S. 2395, 1899.

3) C. Neuberg und H. Wolff, ebendas., Bd. 34, S. 3840 (1901).

quemen Nachweis von Glucuronsäure und Glucosamin nebeneinander gestattet. Beide Methoden ergaben jedoch wiederum ein absolut negatives Resultat.

Nachdem sich so auf den verschiedensten Wegen gezeigt hatte, dass die Glucuronsäure¹⁾ nicht am Aufbau des Moleküls der Chondroitinschwefelsäure betheiligt ist, haben wir versucht, die bei der Barytspaltung des Chondrosins resultirende und von Schmiedeberg als glucuronsaures Baryum angesprochene Verbindung aufzuklären. Die Untersuchung dieser Substanz ergab ein überraschendes Resultat, da sich der fragliche Körper als ein Vertreter der bisher nur selten in der Natur gefundenen Oxyaminosäuren erwies. Zur Darstellung grösserer Mengen der Verbindung haben wir Chondrosinsulfat nach Schmiedeberg's Vorschrift mit Baryt zerlegt und das Filtrat von Baryumsulfat mit gesättigtem Barytwasser 48 Stunden im Brutschrank bei 40° stehen gelassen. Nach dieser Zeit hat sich am Boden des Gefässes ein amorpher, flockiger Niederschlag abgesetzt, der abfiltrirt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Auch diese Substanz, die stickstoffhaltig ist, gibt keine der charakteristischen Proben auf Glucuronsäure. Sie ist aber nicht einheitlicher Natur, wie aus den Reactionen des Rohproductes und denen der schliesslich daraus erhaltenen krystallisirten Verbindungen folgt. Die Barytfällung reducirt nämlich zunächst Fehling'sche Lösung und gibt die Reaction von Molisch-Udránszky mit α -Naphtol und concentrirter

¹⁾ Auch das Vorliegen eines Isomeren derselben scheint uns ausgeschlossen, denn die Aldehydschleimsäure, die der Glucuronsäure entsprechende Verbindung der Galactosereihe, verhält sich bezüglich der Farbenreaction (C. Neuberg, Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 564, 1901) genau wie die Glucuronsäure. Durch einen Destillationsversuch haben wir ferner festgestellt, dass dieselbe durch Salzsäure gleichfalls unter Furfurolbildung zerlegt wird. Da alle Säuren von diesem Typus als Carbonsäuren der entsprechenden Aldopentosen zu betrachten sind, ist bei dem in dieser Hinsicht absolut identischen Verhalten der Pentosen ein anderes Isomeres sehr unwahrscheinlich. Auch für eine Ketosäure haben wir bei dem negativen Ausfall der Seliwanoff'schen Reaction mit Chondrosinlösung keinen Anhaltspunkt gefunden. [C. Neuberg, Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzucker-Industrie, Bd. 51, S. 276 (1900)]

Schwefelsäure. Beide fallen negativ nach der Reinigung aus, die folgendermaassen ausgeführt wurde.

Die Baryumverbindung wurde in möglichst wenig Essigsäure unter schwachem Erwärmen gelöst, mit Ammoniak genau neutralisirt und nach einander mit concentrirter Lösung von Bleiacetat und Bleiessig versetzt, durch die nur minimale Fällungen hervorgerufen wurden. Im Filtrat des Bleisubacetatniederschlages erzeugte Ammoniak eine massige, weisse Fällung. Dieselbe wurde abfiltrirt, gründlich mit Wasser ausgewaschen und in bekannter Weise mit Schwefelwasserstoff Anfangs in der Kälte und dann auf dem Wasserbade zerlegt. Als Filtrat vom Schwefelblei resultirte eine wasserklare Flüssigkeit, die sich auf dem Wasserbade zu einem farblosen Syrup concentriren liess. Da letzterer auch nach längerem Stehen über Natronkalk und Schwefelsäure nicht krystallisirte, wurde er in der 30fachen Menge Wasser gelöst und anhaltend mit überschüssigem Kupfercarbonat gekocht, von dem sich ein Theil mit intensiv blauer Farbe löste. Aus der filtrirten und eingedampften Flüssigkeit schied sich beim Erkalten ein in lazurblauen Nadeln krystallisirendes Kupfersalz ab, das nach 12stündigem Stehen abfiltrirt, mit kaltem Wasser gewaschen und aus heissem Wasser umkrystallisirt wurde. Hieraus krystallisirte es in den erwähnten lazurblauen Nadeln, während es durch Zusatz von Alkohol zur concentrirten wässerigen Lösung in kleineren Formen von erheblich blässerem Farbenton ausfällt. In beiden Fällen ist die Verbindung krystallwasserfrei. Die Ausbeute an diesem Producte betrug ca. 1,2 g aus ca. 25 g ursprünglichem Chondrosinsulfat. Die Analyse des bei gewöhnlicher Temperatur im Vacuum getrockneten Kupfersalzes ergab folgende Zahlen:

0,1652 g Substanz gaben:

0,1936 g CO_2 , 0,0082 g H_2O und 0,0290 g CuO .¹⁾

0,1068 g Substanz gaben:

5,7 ccm. N. (bei 14° und 756 mm) und 0,0189 g CuO .

¹⁾ Als Rückstand im Platinschiff.

Daraus berechnet sich:

C	=	31,99
H	=	5,51
N	=	6,30
Cu	=	14,14: 14,01.

Diese Daten stimmen nun völlig überein mit der Formel des Kupfersalzes einer Hexosaminsäure oder Tetraoxyaminocaprinsäure

$[C_6H_6O_2(OH)_4(NH_2)]_2Cu$, das die Werte

C	=	31,93
H	=	5,32
N	=	6,21
Cu	=	13,98

verlangt.

Mit der Auffassung als einer derartigen Oxyaminosäure ($C_6H_{13}O_6N$) steht auch das übrige Verhalten der Substanz in Einklang. Durch Zerlegung des Kupfersalzes in wässriger Lösung mit Schwefelwasserstoff resultirt eine Lösung der freien Säure, die nicht krystallisirt erhalten werden konnte. Sie trocknet zu einem farblosen Firnis ein, der nicht süß, sondern fade schmeckt. Als Oxyaminosäure charakterisirt sie sich auch dadurch, dass sie in kleinsten Mengen beim Erhitzen direct lichtenspahn-röthende Dämpfe entwickelt, sich also bei der Pyrrolreaction, wie die bisher darauf geprüften Vertreter dieser Körperklasse, das Serin und Isoserin von E. Fischer und H. Leuchs,¹⁾ sowie Glucosaminsäure²⁾ und die beiden stereoisomeren 2-Aminoglucoheptonsäuren von Neuberg und Wolff³⁾ verhält. Gleich der Mehrzahl derselben spaltet sie beim Kochen mit Barytwasser ihre Aminogruppe als Ammoniak ab. Ob hierbei eine Sprengung der Kohlenstoffkette und ein Abbau zu niederen Säuren erfolgt, wie sie Schmiedeberg aus Chondrosin bei gleicher Behandlung erhielt, haben wir

1) E. Fischer und H. Leuchs, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 2662, 1902.

2) C. Neuberg und H. Wolff, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 1913, 1902.

3) C. Neuberg und H. Wolff, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 36, 1903.

aus Mangel an Material noch nicht feststellen können. Hervorzuheben ist ferner, dass weder ein Salz, noch die neue freie Säure selbst die Molischprobe oder überhaupt eine der bekannten Farbenreactionen der Kohlehydrate geben und auch Fehling'sche Lösung nicht reduciren. Sie löst Kupferoxyd mit blauer, Eisenhydroxyd mit brauner Farbe. Aus ihren Lösungen wird sie durch Bleiessig und Ammoniak vollständig niedergeschlagen, durch Bleisubacetat allein in der Hitze partiell gefällt. In der etwa 10%igen Lösung erzeugt Quecksilberacetat bei gelindem Erwärmen einen weissen, amorphien, pulverigen Niederschlag, aus verdünnten Lösungen scheiden sich allmählich feine, büschelförmige Nadeln ab. Sublimat fällt nur nach vorsichtigem Zusatz von Natronlauge. Die Fällung mit Silbernitrat und Barytwasser nach F. Kutscher¹⁾ bleibt unvollständig. Von anderen Verbindungen der neuen Säure haben wir nur noch das Cadmiumsalz krystallisirt erhalten. Dasselbe wurde genau wie das Kupfersalz dargestellt, krystallisirte aber erheblich schwerer, da es sich erst nach Zusatz von Alkohol in kleinen drusenförmig angeordneten Prismen ausscheidet. Die Analyse ergab:

0.2332 g Substanz: 11.6 ccm N bei 15° und 759 mm.

Berechnet für $(C_6H_{12}O_6N_2Cd)$: N = 5.60%.

Gefunden: N = 5.81%.

Ueber die Constitution der Säure, deren wässrige Lösung schwach rechts dreht, können wir vorläufig nichts Sicheres aussagen. Der nicht süsse Geschmack spricht gegen eine α -Aminosäure, die normale Zusammensetzung des Kupfersalzes gegen eine β -Amino- α -Oxysäure, deren bisher bekannte Vertreter nach anderem Typus gebaut sind. Hervorgehoben sei, dass eine stickstoffhaltige Kohlehydratsäure von gleichfalls unbekannter Constitution jüngst von Leo Langstein²⁾ bei der Hydrolyse und peptischen Verdauung des Serumalbumins gefunden ist, und nach der bisherigen kurzen Beschreibung

¹⁾ Fr. Kutscher, Sitzungsber. d. Königl. preuss. Akademie der Wissenschaften, Bd. 26, S. 588, 1902.

²⁾ L. Langstein, Beitr. zur chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 1, S. 259, 1902 u. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 176, 1902.

manche Aehnlichkeiten mit unserer neuen Säure zu besitzen, aber in wesentlichen Punkten, wie Fällbarkeit durch Bleiessig allein, Abspaltung von Furfurol, positiven Ausfall der Molischprobe u. s. w. von ihr verschieden zu sein scheint. Jedenfalls kann die mitgetheilte Analyse der Benzoylverbindung auf ein Gemisch von Tetra- und Pentabenzolat, eine Hexosaminsäure, bezogen werden, sodass eine Beziehung der interessanten Säure von Langstein zu unserer Substanz immerhin denkbar ist.

Auf alle jene Fragen hoffen wir in einer weiteren Mittheilung eingehen zu können, ebenso wie auf die Natur der kohlehydratartigen Substanz, die mit unserer Aminosäure $C_6H_{13}O_6N$ im Chondrosin verbunden ist. Von letzterer, die vermuthlich die Muttersubstanz der von Tollens aus Knorpel erhaltenen Lävulinsäure¹⁾ darstellt, können wir vorläufig nur sagen, dass sie nicht Glucosamin sein kann: denn wenn Chondroitinschwefelsäure die Formel $C_{18}H_{27}O_{17}N$ besitzt oder wenigstens in ihr das Verhältniss $18C:N$ besteht,²⁾ so muss die mit der Säure $C_6H_{13}O_6N$ verbundene Substanz überhaupt stickstofffrei sein. Auch sonst haben wir keinerlei Anhalt für die Gegenwart von Glucosamin gefunden. Aus einer im Autoclaven mit verdünnter Schwefelsäure 2 Stunden lang erhitzten Flüssigkeit haben wir kein Glucosazon darstellen können. Hierbei jedoch, wie bei dem zuvor beschriebenen Versuch zur Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung der Glucuronsäure entstehen kleine Mengen leicht in Alkohol und auch in Wasser löslicher, schwach gelb gefärbter Hydrazinverbindungen, die wir noch nicht in analysenreinem Zustande erhalten konnten. Auch bei der beschriebenen Oxydation mit Salpetersäure, die zur Norisozuckersäure hätte führen müssen, haben wir kein charakteristisches Cinchoninsalz erhalten können, obgleich die Gegenwart einer durch Bleizucker ausfällbaren sauren Substanz die Bildung einer Dicarbonsäure anzeigte. Auf die Beteiligung des Glucosamins am Aufbau des Chondrosins schloss

¹⁾ B. Tollens, Annalen der Chem., S. 243, 315.

²⁾ Das ist übrigens nach den Analysen von Mörner (siehe O. Cohnheim, Chem. der Eiweissk., S. 262) nicht der Fall; aus ihnen ergibt sich das Verhältniss $13C:N$.

Schmiedeberg vornehmlich deshalb, weil beim anhaltenden Kochen sowohl aus Glucosamin, wie aus Chondrosin eine Säure der Formel $C_4H_8O_5$ (Chondronsäure), resp. deren amorphes Baryumsalz $(C_4H_7O_5)_2 Ba$ entsteht. In der That haben wir aus dem Filtrat der flockigen basischen Baryumverbindung unserer Oxyaminosäure nach längerem Kochen mit Baryt und Entfernung des überschüssigen Baryumhydroxyds durch Kohlensäure mittelst Alkoholfällung kleine Mengen einer Substanz erhalten, deren Baryumgehalt (33,70%) nach mehrfachem Lösen in Wasser und Wiederausfällen durch Alkohol nach Trocknung im Exsiccator der Formel $(C_4H_7O_5)_2 Ba$ (berechnet: $Ba = 33,60\%$) entsprach. Durch genaue Zerlegung dieses Baryumsalzes durch Schwefelsäure resultirte eine Flüssigkeit, die ebenso wie das Baryumsalz optisch inactiv war und weder selbst krystallisirte, noch ein krystallisirendes Brucinsalz lieferte. Unterwirft man dagegen d-Glucosaminsulfat (erhalten durch Schütteln der wässerigen Lösung von 250 g des Chlorhydrates mit Silbersulfat) der analogen Behandlung, so erhält man nach 10stündigem Kochen mit concentrirtem Barytwasser sowie Ausfällung des überschüssigen Baryts mit Kohlensäure und nach Filtration von den Zersetzungsproducten eine Lösung, aus der durch viel Alkohol ein gelbliches Salz niedergeschlagen wird. Nach mehrmaligem Lösen in Wasser und Wiederausfällen, sowie Entfernung mit Knochenkohle zeigt es ein Baryumgehalt von 30,82%. Die Verbindung enthält aber Krystallwasser, das beim Trocknen im Vacuum über Phosphorpentoxyd bei 90° entweicht. Der Wasserverlust (8,30%) und der Baryumgehalt entsprechender Formel $(C_4H_7O_5)_2 Ba + 2H_2O$.

Berechn. $Ba = 30,93$; $H_2O = 8,13$ Gef. $Ba = 30,82$; $H_2O = 8,30$.

Ausser durch den Krystallwassergehalt unterscheidet sich diese Substanz aus d-Glucosamin von dem analogen Product aus Chondrosin noch durch ihre optische Activität. Sie ist nämlich rechtsdrehend und liefert bei genauer Zerlegung mit Schwefelsäure eine linksdrehende Lösung. Diese krystallisirt zwar auch nicht, liefert aber bei Behandlung mit Brucin ein reichlich mit Syrup durchsetztes Salz. Auf Thon abgepresst

und zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirt, hat es die Zusammensetzung $C_{27}H_{31}O_9N_2$.

0,2207 g Substanz ergaben:

10,0 cem N bei 14° und 760 mm

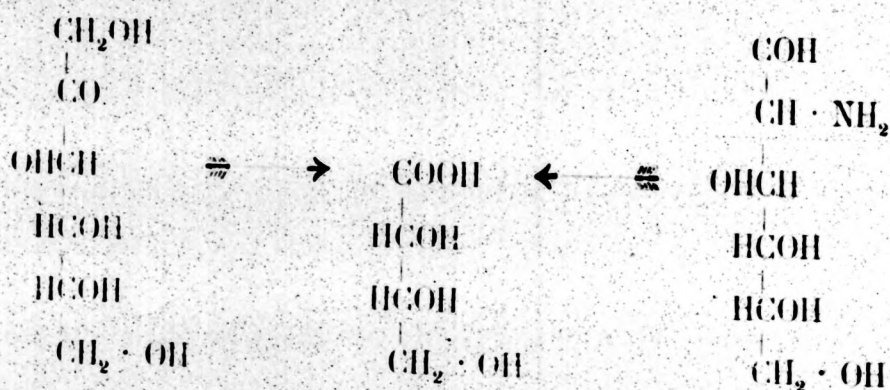
Ber. $C_4H_8O_5 \cdot C_{23}H_{29}O_4N_2$ N = 5,24 Gef. N = 5,40%

Nach den Analysen, wie dem Drehungsvermögen

$$[\alpha]_{D_{15}} = -24,09^\circ$$

$$(l = 1; c = 4,980; a = -1^\circ 12')$$

ist die Substanz identisch mit dem d-erythronsauren Brucin, das von Ruff¹⁾ beschrieben und gleichfalls rechtsdrehend ($[\alpha]_{D_{20}} = -23,5^\circ$) befunden ist. Allerdings ist die Ausbeute an dieser Substanz minimal. Sie beträgt nämlich rund 2 g Alkaloidsalz aus 250 g ursprünglichem, salzsaurem d-Glucosamin. Doch zeigt dieser Versuch, dass wenigstens ein Theil des d-Glucosamins bei andauerndem Kochen mit Baryt in d-Erythronsäure $CH_2OH-(CH \cdot OH)_2-COOH$ übergeht, dass also das Glucosaminmolekül in ähnlicher Weise und an entsprechender Stelle wie Fructose



gespalten wird, aus der von A. Herzfeld und Börnstein²⁾ durch gleichzeitiges Einwirken von Baryt und Quecksilberoxyd zuerst die d-Erythronsäure dargestellt wurde.

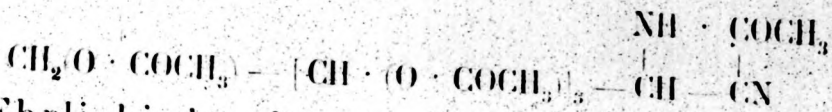
Auch eine andere Reaction, die Dimethylamino-benzaldehydprobe von P. Ehrlich,³⁾ kann nicht mit Sicherheit auf die Gegenwart einer Glucosaminecomponente im Molekül der Chondroitinschwefelsäure bezogen werden. Friedrich

1) O. Ruff, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 32, S. 3678, 1899.

2) A. Herzfeld u. Börnstein, ebendas. Bd. 18, S. 3353, 1885 und Bd. 19, S. 390, 1886.

3) P. Ehrlich, Medicin. Woche, 1901 Nr. 15.

Müller¹⁾ hat zuerst gezeigt, dass jene interessante Reaction von Ehrlich nicht nur einigen Schleimstoffen, sondern einer ganzen Reihe von Proteinen, an deren Aufbau ein acetyliertes Glucosamin betheiligt ist, zukommt und deshalb besondere Beachtung verdient. Auch an der Knorpelsubstanz constatirte Friedrich Müller den positiven Ausfall der Probe nach Behandlung mit Baryt oder Kalilauge. Wie zu erwarten war, fanden wir, dass hierin die Chondroitinschwefelsäure die Trägerin der Reaction ist, die auch noch beim Chondroitin, nicht aber mehr beim Chondrosin eintritt. Im Hinblick auf unseren Befund einer Oxyaminosäure in der Chondroitinschwefelsäure scheint es nicht ohne Interesse, dass sich auch ein jüngst von Neuberg und Wolff (l. c.) beschriebenes acetyliertes Derivat einer Oxyaminosäure, das Pentaacetylglucosaminsäurenitril der Formel



mit dem Ehrlich'schen Reagens nach Behandlung mit Aetz- oder Erdalkalien prachtvoll roth färbt. Da diese neben einer Abspaltung von Acetylgruppen vermuthlich noch eine Verseifung der Nitrilgruppe zum Carboxylrest bewirken und so zu einer niedriger acetylierten Glucosaminsäure führen können, folgt daraus, dass ausser den acetylierten Oxyaminoaldehyden auch die entsprechenden Oxyaminosäuren mit Dimethylaminobenzaldehyd reagiren können.²⁾

Obgleich uns wohl bekannt ist, dass Oddi (l. c.) ein einfaches Verfahren zur Darstellung der Chondroitinschwefelsäure ausgearbeitet hat, wurde für die vorliegende Untersuchung

1) Fr. Müller, Zeitschr. f. Biolog., Bd. 42, S. 562, 1901.

2) Die freie, d. h. nicht acetylierte Oxyaminosäure gibt die Probe ebenso wenig wie reines Glucosamin. Die Wirkung von Alkali auf das erwähnte Pentaacetylnitril der Glucosaminsäure könnte möglicher Weise auch in einer Abspaltung von HCN, d. h. in der Bildung eines Derivates der Acetimidpentose $\text{CH}_2\text{OH} - (\text{CH} \cdot \text{OH})_3 - \text{CH} : \text{N} \cdot \text{COCH}_3$ bestehen.

Auf diese Möglichkeit sei namentlich hingewiesen im Hinblick auf die Studie von Pröscher (Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 520, 1900) über die Ehrlich'sche Reaction mit Harn, wo wahrscheinlich ein Acetylpentosamin oder Formylglucosamin ihren Eintritt bewirkt.

nur ein Material benutzt, das nach Schmiedeberg's Verdauungsmethode u. s. w. gewonnen war und auch diesem Autor zu seiner umfassenden Arbeit gedient hatte, um bei der mangelnden Charakteristik der fraglichen Substanzen möglichste Gewähr für identisches Material zu haben. Denn der von Oddi zur Isolirung der Chondroitinschwefelsäure benutzte Aetzkalk kann nach allen Erfahrungen in der Kohlehydrat-chemie auf die Knorpelsubstanz ganz anders einwirken, als das von Schmiedeberg verwandte Kalium-Kupfer. Hat doch erst kürzlich H. Kiliani¹⁾ wieder betont, dass zwei einander so nahe stehende Substanzen, wie Kalk und Baryt, auf Zucker ganz ungleich reagiren.

Untersuchungen über die Identität der verschiedenen als Chondroitinschwefelsäure bezeichneten Substanzen, sowie über die Constitution der neuen Oxyaminosäure und des mit ihr vermuthlich verbundenen Zuckers sollen den Gegenstand einer weiteren Mittheilung bilden.

Die vorliegende Untersuchung ist mit Unterstützung der Gräfin-Bose-Stiftung ausgeführt, deren Curatorium wir verbindlichst für die Bewilligung der Mittel danken.

1) H. Kiliani, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 3530, 1902.