

# Über die Schwefelsäureester in den Glucoproteiden. I. Schwefel-, Stickstoff-, Hexosamin-, und Uronsäure-Bestimmungen.

Von Tadahiko UTIMARU.

(Eingegangen am 11. Mai 1943.)

Bei den Untersuchungen über die Chondroitinschwefelsäure hat man sich bisher in erster Linie darum bemüht, sie von dem begleitenden Eiweiss möglichst frei darzustellen. Seine Isolierungsweisen vielmals verbessert<sup>(1)</sup>, erzielte man die Verminderung des Stickstoffgehalts und die Vergrösserung des Schwefelgehalts. Die Reinheit der Materialien lässt sich von dem Atomzahlverhältnis von Schwefel zu Stickstoff erkennen. Der Wert dieses Verhältnisses muss nach der Formel, welche 1918 von Levene aufgestellt wurde<sup>(2)</sup>, 1:1 sein. In der Tat nimmt diese Zahl immer zu und nähert sich durch die Verbesserungen der Darstellungsmethoden 1.

Bei der Mucoitinschwefelsäure, welche der Chondroitinschwefelsäure sehr nahe steht, hat man in diesem Verhältnis nicht so grosse Bedeutung bemerkt. Da Heparin als Mucoitinpolyschwefelsäure identifiziert worden ist<sup>(3)</sup>, so überschreitet dieser Wert natürlich 1. Neuerdings hat man tatsächlich eine Substanz dargestellt, die sechs Schwefelatome in einem Molekül enthält. In Bezug auf Chondroitinschwefelsäure hat jedoch niemand schwefelreiches Material gewonnen, ausgenommen die Arbeiten von Soda, Egami und Horigome<sup>(4)</sup>.

Nach diesen Arbeiten ist die Einheitlichkeit von Chondroitinschwefelsäure wenigstens was den Schwefelgehalt anbetrifft zweifelhaft. Heparin ist in der Tat nicht einheitlich. Es besteht aus den Substanzen, welche die verschiedenen Zahlen von Schwefelatomen enthalten<sup>(5)</sup>. Wohl hat Meyer<sup>(6)</sup> in Bezug auf die optische Aktivität verschiedene Arten von Chondroitinschwefelsäuren gefunden, aber was den Schwefelgehalt anbetrifft bezweifelte er nicht dessen Einheitlichkeit. Wenn diese Säure keine bestimmte Zahl von Schwefelatomen hat, so können wir bei der Darstellung von der eiweissfreien Chondroitinschwefelsäure das Atomzahlverhältnis von Schwefel zu Stickstoff als Reinheitsgrad nicht ansehen. Es ist deshalb von Wichtigkeit, wie wir in dieser Arbeit darlegen

(1) K. Kondo, *Biochem. Z.*, **26**(1910), 116; W. W. Sawjalow, *Z. physiol. Chem.*, **126**(1922), 218; E. Jorpes, *Biochem. Z.*, **204**(1929), 354; O. Fürth und T. Bruno, *Biochem. Z.*, **294**(1937) 153; K. Meyer und E. M. Smyth, *J. Biol. Chem.*, **119**(1937), 507.

(2) P. A. Levene und J. Lagez-Suavez, *J. Biol. Chem.*, **36**(1918), 105.

(3) E. Jorpes und S. Bergström, *Biochem. J.*, **33**(1939), 47.

(4) T. Soda, F. Egami und T. Horigome, *J. Chem. Soc. Japan*, **61**(1940), 43.

(5) E. Jorpes und S. Bergström, *J. Biol. Chem.*, **118**(1937), 447.

(6) K. Meyer und E. Chaffee, *J. Biol. Chem.*, **138**(1941), 491.

werden, die Komponenten von Chondroitinschwefelsäure zu analysieren, und dadurch ihre Reinheit zu ermitteln.

Wir bestimmten den Schwefel-, Stickstoff-, Hexosamin-, Hexuronsäure- und Aschengehalt, obwohl Meyer schon deren Analysen ausgeführt hat<sup>(7)</sup>. Seine Methode scheint uns jedoch nicht zuverlässig. Überdies zeigten seine Resultate, dass sein Präparat ausser Hexosamin noch stickstoffhaltige Verunreinigungen enthält, weil der Stickstoffgehalt bedeutend grösser ist als der aus dem Hexosamingehalt berechnete. Ferner zeigte er, dass seine Resultate der Formel von Levene entsprechen würden, wenn die Säure noch sechs Moleküle von Krystallwasser enthielte. Aber nach unseren Erfahrungen können wir leicht das Gewicht der Chondroitinschwefelsäure konstant machen. Wir können nämlich 10 mg Probe bei einer Temperatur von 80° im Vakuum in einer Stunde austrocknen. Dadurch überzeugten wir uns, dass die Menge, welche von Meyer als Wasser erkannt worden ist, aus anderen Verunreinigungen stammt.

Über die Analysenmethode machten wir mehrere Untersuchungen, indem wir eine ziemlich exakte Methode anwendeten, um den Reinheitsgrad des Materials zu beurteilen. Wir führten die Stickstoffbestimmung nach der Mikro-Kjeldahl-Methode aus, dabei titrierten wir mit der Mikrobürette, um exaktere Resultate zu gewinnen. Gewöhnlich benutzten wir dazu die jodmetrische Methode. Wir fanden jedoch, dass wir durch die Acidimetrie mit Methylrot als Indikator genügende Genauigkeit erzielen können, wenn wir vor der Titration die Säurelösung kochen. Nach Meyer<sup>(8)</sup> gibt die Mikro-Dumas-Methode mehr Stickstoffgehalt als die Mikro-Kjeldahl-Methode, aber unsere Erfahrung ist gegen diesen Befund ausgefallen. Die Mikro-Dumas-Methode zeigt immer einen zu kleinen Wert. Wir glauben dass, wie unten erklärt, die Resultate nach der Mikro-Kjeldahl-Methode genau sind.

Für die Uronsäure-Bestimmung hat Meyer die Mikro-Tollens-Lefèvre-Methode angewandt. Diese Methode gibt jedoch bei den Polysacchariden, welche andere Kohlenhydrate als Hexuronsäure enthalten, keine genauen Wert, wie Burkhardt erwähnt<sup>(10)</sup>. Wir fanden wie Meyer einen kleinen Blindwert, wie sorgfältig wir die Kohlensäure in der Luft auch ausschlossen, und daneben entstand aus Hexosamin auch kleine Mengen Kohlensäure. Gewöhnlich zieht man diese Menge aus der der Hauptexperimenten ab, aber dieses Verfahren gilt nicht als richtig. Daher versuchten wir die kolorimetrische Methode, welche von Gurin<sup>(11)</sup> und Egami<sup>(12)</sup> untersucht wurde, wobei man die Farbentstehung von Zucker durch die Behandlung mit Carbazol und konz. Schwefelsäure ausnutzte.

Die Hexosaminbestimmung, die wir ausführten zeigen, dass die Analyse nach Nilsson<sup>(13)</sup> ziemlich befriedigend durchführbar ist. Die

- 
- (7) Z. Zakrzewski und H. J. Fuchs, *Biochem. Z.*, **285**(1936), 390.
  - (8) K. Meyer, E. Smyth und J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.*, **119**(1937), 73.
  - (9) K. Meyer und J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.*, **114**(1936), 689.
  - (10) B. Burkhardt, L. Baur und K. P. Link, *J. Biol. Chem.*, **104**(1934), 171.
  - (11) S. Gurin und D. H. Hood, *J. Biol. Chem.*, **131**(1939), 211.
  - (12) F. Egami, *J. Chem. Soc. Japan*, **62**(1941), 277.
  - (13) L. Nilsson, *Biochem. Z.*, **282**(1935), 242.

Bedingungen der Hydrolyse mit 4 N Salzsäure und der 12 stündigen Erhitzung geben den Maximalwert, und in dieser Beziehung wurde die Angabe von Meyer<sup>(14)</sup> bestätigt. Das allgemeine Verfahren bei der Hydrolyse von Glucosaminverbindungen mit 4 N Salzsäure und der 4-8 stündigen Erhitzung ist bei der Analyse gelegentlich als unvollkommen zu urteilen.

Der Stickstoffgehalt nach der Kjeldahl-Methode stimmt mit den Resultaten der Hexosaminbestimmung ausgezeichnet überein (in der Tabelle 2). Daraus können wir schliessen, dass alle Mengen von Stickstoff als Hexosamin existieren. Dies zeigt erstens, dass unser Material kein Eiweiss enthält, und dass unsere Methoden der Analyse ziemlich genau sind. Dabei fanden wir, dass wir durch zweimalige Fällung mit Trypaflavin alles Eiweiss beseitigen konnten.

Unsere Analysen können alle mit etwa 10 mg Substanz ausgeführt werden. Da wir beabsichtigten, Schwefelsäureester wie Chondroitinschwefelsäure in verschiedenen Tieren zu untersuchen, so hatten wir vor, auch die Schwefelsäure nach der Mikromethode zu bestimmen. Die Schwefelbestimmung wurde nach Fiske<sup>(15)</sup> mit Benzidin vorgenommen. Die Niederschläge von Benzidinsulfat wurden direkt mit Alkali titriert. Die Hydrolyse von der Esterschwefelsäure geht so leicht vor sich, dass man durch diese Methode schnell analysieren und befriedigende Ergebnisse erhalten kann.

Aus den Analysenresultaten nach diesen Methoden können wir schliessen, dass die Chondroitinschwefelsäure aus dem Knorpel durch zweimalige Extrahierungen aus den Niederschlägen von Trypaflavinsalz mit 20%iger Calciumchloridlösung eiweissfrei dargestellt werden kann. Von der mit Calciumchlorid extrahierten Lösung wird die Chondroitinschwefelsäure mit Alkohol abgesetzt. Dieses Material enthält noch etwa

2% Calciumchlorid. Dies kann durch Dialyse gegen dest. Wasser innerhalb 3 Tagen beseitigt werden. Da das chondroitinschwefelsaure Salz jedoch dabei sauer wird, neutralisierten wir sie und setzten sie mit Alkohol ab, um neutrale Chondroitinschwefelsäure zu erhalten.

Die Summe des Gehalts jeder Komponenten betrug 97.0%. Bei den Berechnungen wurde Ester- oder Glucosidform wie in der Levene'sche Formel angenommen, und Hexosamin wurde als Acetylhexosamin berechnet. Die Zahlen (Tabelle 1) zeigen, dass unsere Materialien keine

Verunreinigungen enthalten, zumindest soweit sich dies durch eine genaue Analyse feststellen liess. Ausserdem beweisen sie die Exaktheit unserer Analyse.

(14) J. Palmer, E. M. Smyth und K. Meyer, *J. Biol. Chem.*, **119** (1937), 491.

(15) C. H. Fiske, *J. Biol. Chem.*, **47** (1921), 59.

Tabelle 1.

Analyse von Chondroitinschwefelsäure.

	Nr. 9	Nr. 5
Acetylhexosamin ....	—	35.1
Stickstoff ....	2.43	2.30
Schwefel ....	7.34	7.05
Hexuronsäure ....	39.7	36.7
Asche ....	21.2	29.8
<u>Schwefel</u> ....	1.32	1.32
<u>Stickstoff</u> ....	1.18	1.12
<u>Uronsäure</u> ....		
Hexosamin		

Das Atomzahlverhältnis von Schwefel zu Stickstoff war in allen Materialien etwa 1.3 und das Molekülzahlverhältnis von Uronsäure zu Hexosamin war 1.2.

Woher kommt der Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und denen der anderen Autoren? Röhrt er von der Verschiedenheit der Isolierungsmethode her? Nimmt man unter den Ergebnissen von Meyer<sup>(1)</sup> den Gehalt des Glucosaminstickstoffs als den des Stickstoffs an, so ist das Verhältnis von Schwefel zu Stickstoff 1.21, und das von Uronsäure zu Stickstoff 1.18. Diese Zahlen weichen nicht so sehr aus von unseren Resultaten.

Wie wir diese schwefelreiche Materialien erlangten, röhrt vielleicht auch daher, dass wir sie aus dem Knorpel von Haifisch dargestellt haben. Enthält er schwefelreiche Glucoproteide? Schon früher hat auch Fürth<sup>(1)</sup> gefunden, dass die Chondroitinschwefelsäure aus einigen Fischen schwefelreicher ist. Um diesen Punkt zu klären, werden wir über die Chondroitinschwefelsäure aus dem Säugetierknorpel nach unserer Trypaflavinmethode Untersuchungen anstellen.

### Beschreibung der Versuche.

**1. Darstellung der Materialien.** Wie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben wurde<sup>(4)</sup>, wird die Säure mit Trypaflavin abgesetzt, aus den Niederschlägen mit 20%iger Calciumchloridlösung extrahiert, und mit Alkohol ausgesalzt. Dies wird zweimal wiederholt. Das nach diesem Verfahren erhaltene Material enthält bisweilen eine kleine Menge Calciumchlorid. Daher wird es, um das gereinigte Material zu erhalten, gegen dest. Wasser dialysiert, mit Calciumhydroxyd neutralisiert, und danach das Salz der erwünschten Säure mit Alkohol abgesetzt.

**2. Die Analyse von Stickstoff.** Nach der Mikro-Dumas-Methode kann man keine befriedigende Werte erwarten. Deswegen wird die Mikro-Kjeldahl-Methode angewandt; da aber die Materialien sehr stickstoffarm sind, so muss die Digestion vollkommen ausgeführt werden. Der Apparat von Hayman u. a.<sup>(16)</sup> (Abb. 1), den sie um den Nitrostickstoff in Submikro-Mengen zu analysieren benutzt haben, lässt sich für unseren Zweck gut bedienen.

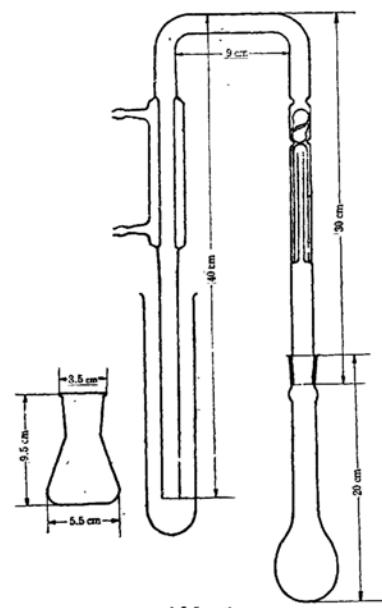


Abb. 1.

6–7 mg der gewogenen Substanz werden vorsichtig in den Kolben eingesetzt. Man beachtet dabei, dass die Substanz nicht an der Kolben-

Tabelle 2.

		N% nach Kjeldahl- Methode	N% aus Hexosamin- Gehalt berechnet.	N% nach Dumas- Methode
Chondroitinschwefelsäure	Nr. 1 .....	2.26	2.20	1.69
"	Nr. 2 .....	2.02	1.92	1.75
"	Nr. 3 .....	1.94	—	1.53
"	Nr. 4 .....	2.00	1.97	—
"	Nr. 5 .....	2.30	2.25	—

wand haftet. Sie wird zuerst mit 1.5 cc konz. Schwefelsäure, sodann mit je 25 mg Kupfersulfat und Kaliumsulfat versetzt. Man erhitzt den Kolben, welcher in beinahe horizontaler Stellung gehalten wird. Wenn etwa nach 20 Minuten die Lösung klar wird, kühlt man sie ab, dann wird sie mit 3 Tropfen Wasserstoffperoxyd versetzt, und bis zu klarer Lösung wieder erhitzt. Dies wird nochmals wiederholt. Danach wird sie mit 40 cc Wasser und 8 cc 50%iger Natriumhydroxydlösung versetzt, und das Ammoniak destilliert. Dabei wird Bleikügelchen als Siedestein benutzt, und befriedigende Resultate wurden erzielt. Da aber nach der Abscheidung von Natriumsulfat die Bleikügelchen nicht mehr ihren Dienst leisten, so wird die Destillation davor eingestellt.

Das Ammoniak wird in 2 cc 0.143 N Salzsäure absorbiert. Dieselbe wird auf Methylrot als Indikator mit 0.143 N Natriumhydroxyd und mit Hilfe der Mikrobürette titriert. Wird dabei die Säurelösung vor der Titration gekocht, dann verändert sich deutlich die Farbe des Indikators.

Die Resultate finden sich in Tabelle 3. Die Fehlergrenze der Experimente liegt unter 0.05%.

Tabelle 3.

	Menge (mg)	N% (Gefund.)	N% (Theoret.)	Zusatz von $H_2O_2$
Glucosaminhydrochlorid .....	2.195	6.12	—	ohne
Acetanilid .....	0.905	9.25	—	"
Glucosaminhydrochlorid .....	1.319	6.58	6.54	mit
" .....	2.245	6.52	6.54	"
Acetanilid .....	1.192	10.00	10.37	"
Chondroitinschwefelsäure Nr. 5 ..	7.404	2.14	—	ohne
" " ..	6.272	2.30	—	mit

**3. Die Analyse von Glucosamin.** Dieselbe wird nach Nilsson<sup>(13)</sup> ausgeführt. Etwa 7 mg des gewogenen Materials werden in ein Röhrchen eingesetzt, welches mit einem gut eingepassten Schliffstopfen versehen ist. 2 cc Wasser und danach 2 cc 8 N Salzsäure werden zugefügt. Das Rohr wird fest zugestopft, und während geeigneter Zeit im Wasserbad erwärmt.

Nach der Hydrolyse wird die Lösung in den 10 cc Messkolben abgefüllt, und mit dest. Wasser bis auf zum 10 cc Teilstrich gebracht. 5 cc dieser Lösung werden zur Vorprobe auspipettiert, und mit 1 N Natriumhydroxyd auf Methylrot als Indikator neutralisiert. Die übrigen 5 cc derselben Lösung wird nun mit 98% der bei der Vorprobe bestimmten Menge von Alkalilösung neutralisiert. Diese Lösung wird wieder auf 10 cc gebracht. 1 cc davon wird mit Acetylaceton und Ehrlichschem Reagens gefärbt. Die Durchlässigkeit der Lösung wird im Zeiss-Stufenphotometer mit Filter S53 gegen eine Blindprobe, die alle Reagenzien ausser dem Substrat enthält, bestimmt.

Die Bedingungen der Hydrolyse wurden untersucht (Tabelle 4), und festgestellt, dass die 12 stündige Hydrolyse die geeigneteste ist. Wenn man das Glucosamin unter den gleichen Bedingungen hydrolysiert, so geht 4% an der Menge verloren. Daher wird der Glucosamingehalt um diese Menge korrigiert.

Tabelle 4.

Bedingungen	Hexosaminhydrochlorid	
	r	%
Chondroitinschwefelsäure Nr. 3 450γ..... 4NHCl, 6 St.	115	—
"      "      "      "..... 2NHCl, 6 St.	100	—
"      "      "      "..... 4NHCl, 12 St.	155	—
"      "      "      "..... 2NHCl, 12 St.	125	—
"      "      "      "..... 4NHCl, 25 St.	132	—
Glucosaminhydrochlorid 124γ..... 4NHCl, 12 St.	119	(96 %)
"      110γ..... "      "..... 106		(96.5%)
Chondroitinschwefelsäure Nr. 5 366γ..... "      "..... 122		33.2

**4. Die Analyse von Glucuronsäure.** Anfangs wird die Entstehung von Kohlensäure nach Burkhart, Bauer und Link gemessen. Die Glucuronsäure wird zuerst analysiert. Es zeigt sich jedoch, dass die Bedingungen dieser Autoren, 12 N Salzsäure und 135–138°, nicht ausreichend sind. Man findet immer zu kleine Werte. Dies röhrt vielleicht daher, dass diese Autoren gerade die Galacturonsäure untersuchten. Aus der Glucuronsäure, wie zu erwarten, entsteht eine kleinere Menge Kohlensäure. Ausserdem waren die Resultate dabei nicht einheitlich. Es ist vielleicht auf die Unvollkommenheit der Zersetzung zurückzuführen.

Daher wird hier die kolorimetrische Methode von Gurin u. a. und Egami<sup>(11)(12)</sup> benutzt. Sie beruht auf der Farbentstehung von Glucuronsäure mit Carbazol, und ist um so vorteilhafter, da man gleichzeitig qualitativ die Zuckerarten entscheiden kann. Das Verhältnis der Extinktion bei 530 m $\mu$  zu der bei 500 m $\mu$  zeigt, dass die Uronsäure in der Chondroitinschwefelsäure Glucuronsäure ist. Aber die Absorption bei 430 m $\mu$  und 470 m $\mu$  von Chondroitinschwefelsäure stimmt mit der von Glucuronsäure nicht überein. Es kommt vielleicht daher, dass die Glucuronsäure dabei mit dem Glucosamin verbunden ist. Tatsächlich zeigt das Gemisch von Glucuronsäure und Glucosamin die gleichen Veränderungen bei dieser Wellenlänge, und die Absorption ist grösser als bei Glucuron-

säure allein. Dass man jedoch mit der Extinktion bei  $500 \text{ m}\mu$  analysieren kann, zeigen die Resultate der Versuche, die über das Gemisch von chondroitinschwefelsäure und Glucuronsäure ausgeführt worden sind.

Tabelle 5.

Menge ( $\gamma$ )	$\epsilon_{530}/\epsilon_{500}$	Glucuronsäure	
		$\gamma$	%
Glucuronsäure .....	—	1.30	—
” .....	—	1.32	—
Chondroitinschwefelsäure Nr. 9 .....	584	1.26	232 39.7
Glucuronsäure und Chondroitinschwefelsäure Nr. 5 .....	58 284	— —	152

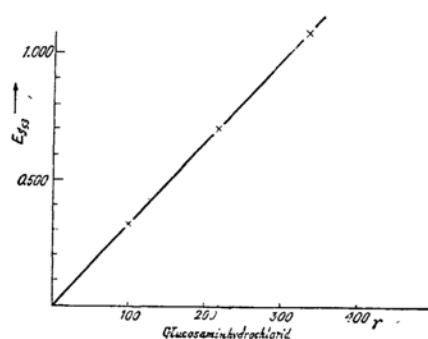


Abb. 2.

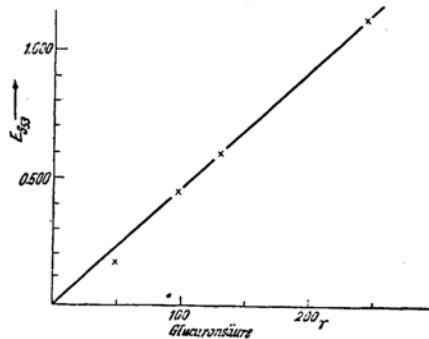


Abb. 3.

**5. Die Analyse der Esterschwefelsäure.** Diese Bestimmung wird nach dem von Fiske<sup>(15)</sup> verbesserten Rosenheim und Drummond'schen Verfahren ausgeführt. Etwa 3 mg des Materials werden in 4 cc Wasser gelöst, mit 1 cc 20%iger Salzsäure und 2 Tropfen 1.2%iger Natriumchloridlösung versetzt und auf dem Wasserbad abgedampft. Danach mit 1 Tropfen konz. Salpetersäure und 5 Tropfen konz. Salzsäure versetzt und wieder abgedampft und noch 10 Minuten lang erwärmt. Dann wird der Rückstand mit 5 cc Wasser in ein Becherglas übertragen, mit 2 cc Benzidinlösung und nach 2 Minuten mit 4 cc 95%igem Aceton versetzt, und dies weiter 10 Minuten stehen gelassen. Dann wird das Benzidinsulfat nach Fiske filtriert. Das Sulfat wird zusammen mit dem Filtrierpapier in einem grossen Reagenzglas mit 0.01 N Natriumhydroxydlösung auf Phenolrot als Indikator unter stetigem Kochen titriert.

Tabelle 6.

Menge (mg)	Schwefel $\gamma$	Schwefel	
		$\gamma$	%
Chondroitinschwefelsäure Nr. 7 ..	—	—	6.25
” Nr. 8 ..	—	—	7.41
Schwefelsäure .....	(S=160 $\gamma$ )	162	—
Chondroitinschwefelsäure Nr. 7 ..	4.38	280	6.58
” Nr. 8 ..	3.74	283	7.45

} nach Gewichtsanalyse

} nach Fiske

Diese Methode gibt denselben Wert wie die gewöhnliche gravimetrische Methode.

Diese Arbeit wurde durch Rat und Beistand von Herrn Prof. Tokuro Soda ausgeführt. Herrn Prof. Fujio Egami verdanke ich seiner stetigen Anregung. Die Glucuronsäure zur Analyse stellte mir Herr Prof. Choji Araki freundlichst zur Verfügung. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen. Die Kosten dieser Arbeit wurde zum Teil von den Ausgaben des Unterrichtsministeriums für wissenschaftliche Forschungen finanziert.

*Chemisches Institut, Naturwissenschaftliche Fakultät,  
Kaiserliche Universität zu Tokio.*

---