

## 575. C. Neuberg und H. Wolff: Ueber den Nachweis von Chitosamin.

[Aus dem chemischen Laborat. des patholog. Instit. d. Univ. Berlin.]

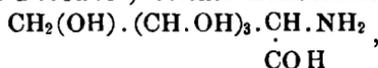
(Eingegangen am 12. November 1901.)

Untersuchungen der letzten Jahre, die hauptsächlich von Vertretern der physiologischen und medicinischen Chemie ausgeführt sind, haben im Thier- und Pflanzen-Reich die weite Verbreitung von Chitin und ähnlichen amidirten Polysacchariden erkennen lassen, die bei der Hydrolyse Salze der Aminohexose Chitosamin liefern. Besonderes Interesse hat das Vorkommen dieses letzten Körpers unter den Spaltungsproducten verschiedener Proteinstoffe erregt.

Die Methode, die in fast allen diesen Fällen zum Nachweis des Chitosamins gedient hat, verdanken wir den grundlegenden Forschungen Friedrich Müller's und seiner Schüler<sup>1)</sup>. Sie gründet sich auf die Ueberführung des Chitosamins in seinen Benzoësäureester und deren Trennung von den Benzooaten der übrigen Spaltungsproducte. Diese gelingt aber nicht immer leicht und führt zu Gemischen von amorphen niederen Estern mit relativ wenig Tetrabenzoyl- und Pentabenzoyl-Chitosamin, die krystallisirt sind. Zur sicheren Identificirung muss deshalb der Aminozucker durch Verseifung regenerirt werden, wozu grössere Materialmengen erforderlich sind. Ueberdies wird bei der Benzoylirung nach Schotten-Baumann die Ausbeute durch die bekannte Empfindlichkeit des Chitosamins gegen wässrige Alkalien beeinträchtigt, sodass der Nachweis dieses Kohlehydrats in einzelnen Fällen der nöthigen Sicherheit ermangelt, die nach F. N. Schulz's Entdeckung einer in Eiweisskörpern zuweilen vorkommenden Aminogalactose um so mehr geboten erscheint.

Es wurde nun die Charakterisirung des »Eiweisszuckers« auf dem früher von dem Einen<sup>2)</sup> von uns gelegentlich der Isolirung der Harnpentose angekündigten Wege versucht, der auf Abscheidung des Zuckers als Hydrazon beruht. Reines Chitosamin-Chlorhydrat oder Bromhydrat geben zwar leidlich krystallisirende Hydrazone (s. exper. Theil), aber dieselben scheiden sich nicht aus dem Substanzgemisch ab, das bei der Hydrolyse von Proteinstoffen entsteht.

Die von Emil Fischer<sup>3)</sup> betonte Aehnlichkeit des Chitosamins,



mit dem niedrigsten Aminoaldehyd, dem Amino-acetaldehyd,  $\begin{matrix} \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2 \\ | \\ \text{COH} \end{matrix}$ ,

<sup>1)</sup> Fr. Müller, Sitzungsber. zur Bef. d. Naturw. Marburg u. Basel 1896—1900. Seemann, Marb. Dissertation 1898.

<sup>2)</sup> C. Neuberg, diese Berichte 33, 2254 [1900].

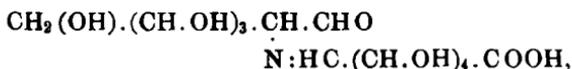
<sup>3)</sup> Diese Berichte 26, 95 [1893].

legte es nahe, die von Wohl und Marckwald<sup>1)</sup> ausgeführte Ueberführung des Letzteren in gut krystallisirende Imidazolderivate auf die Aminohexose zu übertragen. Die Abscheidung der in reinem Zustande vortrefflich krystallisirenden Substanzen aus den Spaltungsproducten von Eiweisskörpern wird durch die Bildung von Thiocarbamidderivaten aus gleichzeitig entstandenen Aminosäuren gestört.

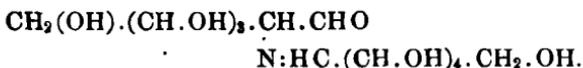
Allein brauchbar erwies sich ein auf anderer Grundlage beruhendes Verfahren, die Oxydation des Chitosamins zu der charakteristischen Norisozuckersäure. Die Darstellung derselben gelingt auch bei Gegenwart von anderen Spaltungsproducten der Proteinstoffe, von denen sie leicht als Bleisalz trennbar ist. Die aus Letzterem mit Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzte Säure bildet mit Cinchonin oder Chinin Salze, die im Gegensatz zu den bisher bekannten Norisozaccharaten ein selbst bei Alkaloidsalzen selten schönes Krystallisationsvermögen besitzen.

Nach den Untersuchungen von E. Fischer und Tiemann<sup>2)</sup> entsteht Norisozuckersäure, resp. ihr Anhydrid, die Isozuckersäure, nur aus Chitosamin oder Chitin (und den künstlich aus beiden gewonnenen Derivaten). Die Isolirung von Norisozaccharaten ist deshalb für Chitosamin durchaus beweisend.

Die angedeutete Methode gewährt auch noch einen weiteren Vortheil. Wie erwähnt, begegnet man auch einer Aminogalactose unter den Spaltungsproducten von Proteinstoffen; ausserdem soll Chitosamin selbst in der Natur häufig in Verbindung mit anderen kohlehydratartigen Substanzen vorkommen, so mit Glucuronsäure im Chondrosin von Schmiedeberg:



und mit Gulose im Paramucosin von Leathes:



Die Paarlinge des Chitosamins und ebenso die Aminogalactose gehen bei der Oxydation des Chitosamins zur Norisozuckersäure gleichfalls in zweibasische Säuren über, die beiden Ersteren in gewöhnliche Zuckersäure, Letztere in Schleimsäure.

Diese drei Säuren sind nun leicht neben einander nachzuweisen. Zuckersäure und Schleimsäure geben mit Phenylhydrazin die bekannten schwer löslichen Doppelhydrazide, während das Norisozuckersäurephenylhydrazid wegen seiner grossen Löslichkeit nicht isolirt

<sup>1)</sup> Diese Berichte 22, 572 [1889].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 17, 246 [1884]; 27, 118, 138 [1894].

werden konnte. Die Alkaloidsalze der Zuckersäure sind sehr viel leichter löslich als die entsprechenden Norisosaccharate, in deren Mutterlaugen sie sich bei Gegenwart beider Säuren befinden. Schleimsäure unterscheidet sich ausser durch ihr optisches Verhalten, durch ihre Schwerlöslichkeit von den beiden anderen Dicarbonsäuren.

### Experimenteller Theil.

Chitosaminchlorhydrat-*p*-nitrophenylhydrazon,  
 $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot(\text{CH}\cdot\text{OH})_3\cdot\text{CH}(\text{NH}_2\cdot\text{HCl})\cdot\text{CH}:\text{N}\cdot\text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)$ .

Zu einer Lösung von 2.15 g Chitosaminchlorhydrat in 10 ccm Wasser fügt man eine Lösung von 1.53 g *p*-Nitrophenylhydrazin in 50 ccm absol. Alkohol; nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur dampft man im Vacuum ein. Es hinterbleibt eine gelbrothe Masse, die bei öfterem Durchrühren mit einem Gemisch gleicher Theile Alkohol und Aether hellgelb wird. Zur Reinigung löst man in möglichst wenig heissem Wasser, fügt die 20-fache Menge absol. Alkohols hinzu, kocht mit Knochenkohle und engt das Filtrat unterhalb 40° ein; nur dann erhält man ein unzersetztes Product.

Mikroskopische Krystallnadeln, die sich bei 202° dunkel färben und sich bei 210° unter lebhafter Gasentwicklung zersetzen.

Die Substanz löst sich in Wasser mit hellgelber Farbe, die durch fixe Alkalien tiefroth, durch Kohlensäure und Ammoniak rosa wird (Bamberger'sche Reaction). Schwer löslich in Alkohol und Pyridin, unlöslich in den übrigen organischen Solventien.

0.2304 g Sbst.: 32.5 ccm N (20°, 757 mm). — 0.2020 g Sbst.: 0.0819 g AgCl.

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_4\text{Cl}$ . Ber. N 15.98, Cl 10.13.  
 Gef. » 16.10, » 10.01.

Die spezifische Drehung <sup>1)</sup> der Substanz ist:

$$[\alpha]_D = -75^\circ$$

$$(c = 2, \alpha = -1^\circ 30').$$

Chitosaminbromhydrat-*p*-nitrophenylhydrazon,  
 $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot(\text{CH}\cdot\text{OH})_3\cdot\text{CH}(\text{NH}_2\cdot\text{HBr})\cdot\text{CH}:\text{N}\cdot\text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)$ ,

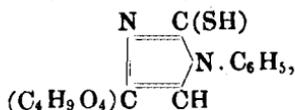
entsteht aus 2.60 g bromwasserstoffsauerm Chitosamin und 1.53 g *p*-Nitrophenylhydrazin, ebenso wie das Chlorhydrat. Es ist empfindlicher und in allen Solventien etwas leichter löslich als Letzteres; von 190° an zersetzt es sich langsam.

0.1916 g Sbst.: 0.0904 g AgBr.

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_4\text{Br}$ . Ber. Br 20.25. Gef. Br 20.05.

<sup>1)</sup> Dieselbe ist hier, wie in den folgenden Fällen, in wässriger Lösung im Decimeterrohr am Halbschattenapparat bei Natriumlicht bestimmt.

$\alpha$ -Tetraoxybutyl- $\nu$ -Phenyl-imidazolyl- $\mu$ -mercaptan <sup>1)</sup>,



Als Verbindung dieser Constitution ist wahrscheinlich die Substanz anzusprechen, die aus äquimolekularen Mengen Chitosamin und Phenylsenföf unter Austritt von 1 Mol. Wasser auf zwei Weisen entsteht:

$\alpha$ ) Uebergiesst man 3.6 g freies Chitosamin mit 2.0 g Phenylsenföf, so löst sich der Aminozucker beim Schütteln unter Erwärmung, und nach einiger Zeit erstarrt das Gemisch zu einem gelbgefärbten Krystallbrei. Nach dem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol unter Zusatz von etwas Knochenkohle erhält man weisse, lang gestreckte Prismen vom Schmp. 208°, die mit der unter  $\beta$ ) beschriebenen Substanz identisch sind.

$\beta$ ) Unter den Spaltungsproducten von Proteinstoffen befindet sich das Chitosamin nur als Salz. Aus einem solchen lässt sich das Chitosamin, selbst wenn es rein ist, nur schwierig und unter besonderen Vorsichtsmaassregeln als freie Base <sup>2)</sup> erhalten, aber nicht aus verunreinigten Lösungen. Deshalb war allein die Darstellung obiger Verbindung aus einem Chitosaminsalz von Interesse.

Schüttelt man die concentrirte, wässrige Lösung von Chitosaminchlorhydrat mehrere Stunden mit der äquivalenten Menge Natriumbicarbonat und Phenylsenföf, so erfolgt keine Vereinigung. Arbeitet man in alkoholischer Lösung, so erhält man nach dem Verdampfen im wesentlichen Phenylsulfourethan,  $\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5) \cdot \text{CS} \cdot \text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_5$ , durch Anlagerung von Aethylalkohol an das Thiocarbanil.

Zum Ziel kommt man allein durch Verwendung von Aceton als Lösungsmittel.

Man löst 4.3 g salzsaures Chitosamin in möglichst wenig kaltem Wasser, fügt die berechnete Menge Natriumcarbonatlösung, 2 g Phenylsenföf und soviel Aceton hinzu, dass eine klare Mischung entsteht. Nach 48-stündigem Stehen verdampft man auf dem Wasserbade; es hinterbleibt ein schnell erstarrendes Oel. Die mit wenig kaltem Wasser gewaschene Substanz wird durch Krystallisation aus heissem Alkohol von anhaftendem Kochsalz befreit.

Die Verbindung bildet durchsichtige, derbe Prismen; aus heissem Wasser schießt sie in federförmigen, bis 1 cm langen Nadeln an;

<sup>1)</sup> Nomenclatur nach Hantzsch, Ann. d. Chem. 249, 4.

<sup>2)</sup> C. A. Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein, Koninklijke Academie van Wetenschappen te Amsterdam 1897; R. Breuer, diese Berichte 31, 2194 [1898].

leicht löslich in heissem Alkohol und Wasser, wenig löslich in beiden in der Kälte und in wasserfreiem Aceton, unlöslich in Essigester und Benzol.

Die Substanz ist optisch activ.

$$[\alpha]_D = + 58^{\circ}20'$$

$$(c = 2, \alpha = 1^{\circ}10').$$

Multirotation wurde nicht beobachtet; die Drehung bleibt mehrere Stunden unverändert und nimmt dann ab, da ein Theil der Verbindung wieder ausfällt.

0.2032 g Sbst. (Präp.  $\beta$ ): 0.3951 g CO<sub>2</sub>, 0.1022 g H<sub>2</sub>O. — 0.1828 g Sbst. (Präp.  $\beta$ ): 15.3 ccm N (19°, 752 mm). — 0.2330 g Sbst. (Präp.  $\beta$ ): 0.1861 g BaSO<sub>4</sub>. — 0.1972 g Sbst. (Präp.  $\alpha$ ): 16.5 ccm N (20°, 757 mm).

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S. Ber. C 52.70, H 5.41, N 9.46, S 10.81.

Gef. (Präp.  $\beta$ ) » 53.03, » 5.58, » 9.52, » 10.99.

» ( »  $\alpha$ ) » » » » 9.53.

Die Verbindung ist demnach aus 1 Molekül Chitosamin und 1 Molekül Phenylsenföl unter Austritt von 1 Molekül Wasser entstanden:



Da die Substanz keine Reductionswirkung auf Fehling'sche Mischung oder ammoniakalische Silberlösung äussert, enthält sie keine Aldehydgruppe; sie besitzt aber schwach saure Eigenschaften, da sie mit Schwermetallen Salze bildet.

Die concentrirte wässrige Lösung giebt:

mit AgNO<sub>3</sub> flockige, weisse Fällung. Das Silbersalz löst sich in heissem Wasser und fällt beim Erkalten gallertartig aus;

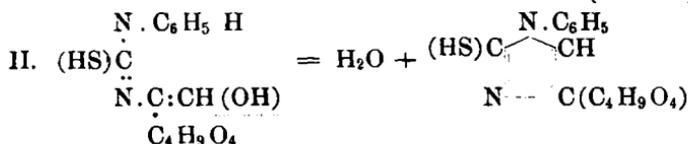
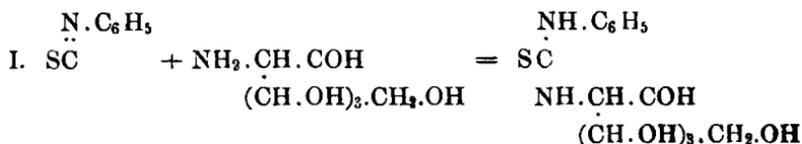
mit CuSO<sub>4</sub> einen dunkelbraunen Niederschlag, der in heissem Wasser mit hellgrüner Farbe löslich ist;

mit HgCl<sub>2</sub> farblose, flockige Fällung;

mit concentrirter Schwefelsäure entwickelt die Substanz bei sehr gelindem Erwärmen schweflige Säure.

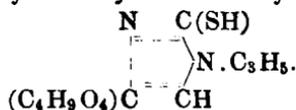
Alle diese Eigenschaften stehen im besten Einklang mit der Auffassung der Substanz als  $\mu$ -Mercaptan des  $\alpha$ -Tetraoxybutyl- $\nu$ -phenyl-imidazols.

Die Bildung desselben erklärt sich so, dass zunächst aus dem Aminozucker und Phenylsenföl der Chitose-phenyl-thioharnstoff (I) entsteht, der dann in einer bei Thiocarbamidderivaten nicht ungewöhnlichen tautomeren Form unter Wasserverlust in das cyclische Mercaptan (II) übergeht:



Beim  $\nu$ -Phenyl-imidazolyl- $\mu$ -mercaptan, das aus Aminoacetaldehyd und Phenylsenföhl entsteht und dessen Constitution von Wohl und Markwald (loc. cit.) bewiesen ist, fanden die Autoren ganz ähnliche Eigenschaften.

$\alpha$ -Tetraoxybutyl- $\nu$ -allyl-imidazolyl- $\mu$ -mercaptan,



Die Allylverbindung entsteht ebenso wie die Phenylverbindung aus Chitosamin und Allylsenföhl in Acetonlösung; sie krystallisirt etwas schwerer und ist in allen Solventien etwas leichter löslich.

Rein weisse, langgestreckte Prismen vom Schmp. 138°.

0.1732 g Subst.: 16.3 ccm N (19°, 757 mm).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ . Ber. N 10.79. Gef. N 10.81.

Die concentrirte Lösung der Substanz giebt mit denselben Schwermetallsalzen, wie die Phenylverbindung, und ausserdem mit Bleiacetat flockige Fällungen.

Norisozuckersaures Cinchonin.

In der wässrigen Lösung von freier Norisozuckersäure oder in einen Gemisch von Noriso- und Iso-Zuckersäure löst man unter Erwärmen Cinchonin bis zur deutlich alkalischen Reaction, filtrirt nach dem Abkühlen und schüttelt die geringen, in Lösung gegangenen Mengen von freiem Alkaloid mit Essigester aus. Dann verdampft man auf dem Wasserbade, wobei schon in der Hitze die Krystallisation beginnt; in der Kälte erstarrt die Masse zu einem Haufwerk feiner Nadeln. Bei langsamer Abscheidung erhält man centimeterlange, derbe Prismen, bei schneller Abscheidung biegsame Nadelchen in fast quantitativer Ausbeute.

Die Substanz schmilzt bei 207°, nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus heissem Wasser bei 208°.

Löslich in heissem Wasser, wenig löslich in kaltem, etwas löslich in heissem Alkohol, unlöslich in Aceton, Chloroform, Essigester und Benzol.

Das Salz ist einheitlich, mag man von reiner Norisozuckersäure oder deren Gemisch mit Isozuckersäure ausgehen; lufttrocken scheint

es 2 Mol. Krystallwasser zu enthalten, die langsam über concentrirter Schwefelsäure entweichen:

0.1672 g Sbst. verlieren nach 48 Stdn. 0.0071 g.

$C_6H_{10}O_8(C_{19}H_{22}N_2O)_2 + 2 H_2O$ . Ber.  $H_2O$  4.32. Gef.  $H_2O$  4.25.

0.1944 g Sbst. (bei 105° getr.): 0.4729 g  $CO_2$ , 0.1190 g  $H_2O$ . — 0.2103 g Sbst.: 12.6 ccm N (17°, 766 mm).

$C_6H_{10}O_8(C_{19}H_{22}N_2O)_2$ . Ber. C 66.17, H 6.77, N 7.02.

Gef. » 66.34, » 6.80, » 7.00.

$$[\alpha]_D = +175^\circ$$

$$(c = 1; \alpha = 1^\circ 45').$$

#### Norisozuckersaures Chinin

entsteht ebenso wie das Cinchoninsalz, dem es in Aussehen und Löslichkeitsverhältnissen sehr ähnlich ist. Schmp. 207°.

0.2444 g Sbst. (bei 105° getrocknet): 13.9 ccm N (16°, 760 mm).

$C_6H_{10}O_8(C_{20}H_{24}N_2O)_2$ . Ber. N 6.53. Gef. N 6.64.

$$[\alpha]_D = -125^\circ$$

$$(c = 1; \alpha = -1^\circ 15').$$

#### Norisozuckersaures Brucin

erhält man auf dieselbe Weise wie das Cinchoninsalz. Da es etwas leichter löslich ist, verdampft man die Lösung auf dem Wasserbade zum dünnen Syrup, der nach dem Erkalten langsam von selbst, fast augenblicklich beim Reiben erstarrt. Nach dem Umkrystallisiren aus Alkohol von 30 pCt. erhält man farblose feine Nadelchen, die bei 100° getrocknet, den Schmp. 199° haben.

0.1993 g Sbst.: 10.0 ccm N (19°, 754 mm).

$C_6H_{10}O_8(C_{23}H_{26}N_2O)_2$ . Ber. N 5.61. Gef. N 5.72.

Die Alkaloidsalze der Norisozuckersäure sind dadurch ausgezeichnet, dass sie aus reinen Ausgangsmaterialien sofort in reinem Zustande entstehen; unter ihnen besitzt namentlich das Cinchoninnoriso-sacharat Eigenschaften, die es zur Isolirung der Norisozuckersäure und damit indirect zur Erkennung von Chitosamin besonders befähigen.

#### Berichtigungen.

Jahrgang 34, S. 3367, Z. 6 v. u. ist »theils« zu streichen.

» 34, » 3367, » 4 v. u. lies: »worden« statt »werden«.