

hinterblieben Krystalle der Verbindung XX. Sie wurden aus Benzol umkrystallisiert und schmolzen dann bei 115° (korr.).

4.615 mg Sbst.: 0.241 ccm N (23° , 749 mm, nach Pregl).

$C_{10}H_{11}O_5N$ (225.1). Ber. N 6.22. Gef. N 5.94.

Die Substanz bildet dünne Nadeln. Mit Salzsäure erhitzt, gibt sie eine kirschrote Färbung. Ein Gemisch der Substanz mit dem Körper V schmolz bei 85° , gab also starke Depression.

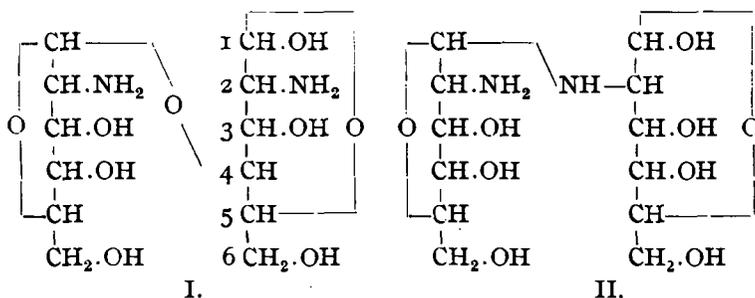
395. Max Bergmann, Leonidas Zervas und Efim Silberkweit: Über Chitin und Chitobiose.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung in Dresden.]

(Eingegangen am 24. August 1931.)

Wir hatten den Wunsch, chemische Unterlagen für die Verknüpfung der Glucosaminreste im Chitin zu gewinnen. Darum suchten wir nach definierten Spaltprodukten des Chitins mit 2 Glucosaminresten. Durch Acetolyse von Chitin aus Hummerschalen erhielten wir das Octacetat eines Disaccharids, das wir Chitobiose nennen. Damit wird zum erstenmal ein krystallisiertes Disaccharid des Glucosamins bekannt.

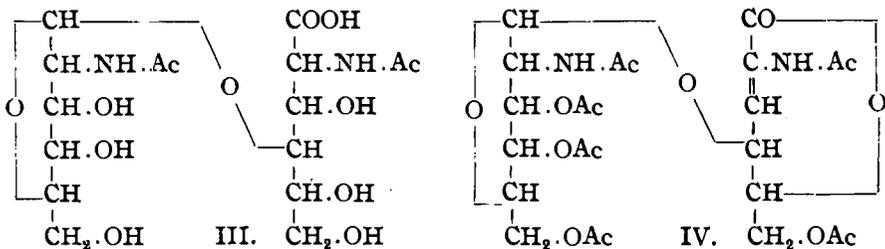
Wir geben der Chitobiose die Strukturformel I und zwar aus folgenden Gründen: Ihr Octacetat nimmt beim Versuch der Nachacetylierung kein neuntes Acetyl auf. Von verd. Alkali werden 6 Acetylene verseift, während 2 Acetylene im Chitobiose-Molekül erhalten bleiben. Sie sind offenbar an Stickstoff gebunden. Wären die beiden Glucosaminreste der Chitobiose durch C—N—C-Bindung verknüpft, z. B. nach Formel II, so wäre die Möglichkeit zur Aufnahme von 9 Acetylen gegeben. Zwei von den Acetylen würden zwar



an Stickstoff Platz finden, aber das an der Stickstoffbrücke der C—N—C-Bindung sollte empfindlich gegen Alkali sein. Der gegenteilige Ausfall des Experiments spricht gegen die Formulierung der Chitobiose nach Formel II. Schon damit ist C—N—C-Bindung ausgeschlossen. Weitere gewichtige Gründe werden wir noch später anführen.

Octacetyl-chitobiose verbraucht bei Behandlung mit Alkali hypodit in Gegenwart von so viel Alkali, daß die *O*-Acetylene verseift werden können, 1 Mol. Hypodit unter Bildung einer Carbonsäure (Diacetylchitobionsäure, III). Demnach enthält Chitobiose eine freie Aldehydgruppe (Lactolgruppe). Chitobiose ist also ein reduzierendes Disaccharid.

Für die Verknüpfung der beiden Amino-Zucker scheiden nach dem Gesagten die Substitutionsorte 1 und 2 im reduzierenden Zuckerrest aus. Geht man von der heute allgemein angenommenen Pyran-Struktur der Aldohexosen aus, so bleibt für die Verknüpfung der beiden Zucker in der Chitobiose noch zu entscheiden übrig, ob sie in Stellung 3, 4 oder 6 des reduzierenden Glucosaminrestes erfolgt. Als Ausgangsmaterial für diese Entscheidung diente uns die bereits erwähnte Diacetyl-chitobionsäure (III), die als eine durch den Glucosaminrest glucosidisch substituierte Glucosaminsäure zu betrachten ist.

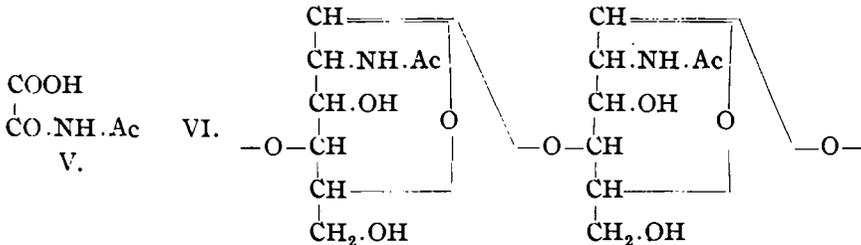


In der voranstehenden Mitteilung haben wir gezeigt, daß freie Glucosaminsäure, sofern sie in 4,5-Stellung nicht substituiert ist, bei der Acetylierung mit Essigsäure-anhydrid und Natriumacetat unter zweifacher Wasser-Abspaltung 2 Doppelbindungen ausbildet, und zwar in 2,3- und 4,5-Stellung. Chitobionsäure bildet bei der gleichen Behandlung nur eine Doppelbindung aus. Sie geht nämlich in das Lacton einer 6-fach acetylierten 2,3-ungesättigten Säure (IV) über. Die Stellung der Doppelbindung in 2,3 folgt schon aus der erhöhten hydrolytischen Empfindlichkeit der einen C—N-Bindung: Durch verd. Salzsäure wird Salmiak abgespalten. Ferner führt die Einwirkung von Ozon zur Bildung von Acetoxamidsäure (V). Mithin ist ausgeschlossen, daß Chitobionsäure eine in 3-Stellung substituierte Glucosaminsäure bzw. Chitobiose ein in 3 substituiertes Glucosamin ist. Übrigens bedeutet die Entstehung der Acetoxamidsäure einen weiteren Gegenbeweis gegen eine Verknüpfung der Glucosaminreste durch C—N—C-Bindung im Sinne der Formel II. Da bei der Acetylierung der Chitobionsäure nur eine einzige Doppelbindung, und zwar in 2,3-Stellung, entsteht, schließen wir, daß in der Chitobionsäure bzw. der Chitobiose das 6-Hydroxyl frei, dagegen das Hydroxyl in 4- oder das in 5-Stellung durch den zweiten Glucosaminrest substituiert ist. Wenn man, wie wir das tun, die Pyran-Struktur zugrunde legt, so bleibt für die Verknüpfung nur die 4-Stellung in Frage, entsprechend der Formel I der Chitobiose. Ob es sich um ein α - oder β -Saccharid handelt, müssen wir dahin gestellt lassen, da die Entscheidung mit Hilfe der gewöhnlichen α - und β -Glucosidasen in diesem Fall wohl kaum in Frage kommt.

Nach unseren Versuchen ist also Chitobiose nach demselben Struktur-Prinzip gebaut wie Cellobiose und Maltose. Für den Aufbau des Chitins bestätigen unsere chemischen Feststellungen die von K. H. Meyer und H. Mark¹⁾ auf Grund röntgen-optischer Untersuchung als wahrscheinlich angenommene Struktur.

¹⁾ B. 61, 1936 [1928].

Demnach ist das Chitin als eine Kette von *N*-acetylierten Glucosaminresten zu betrachten, in welcher die Lactolgruppe jedes Glucosaminrestes in die 4-Stellung des nächsten Glucosaminrestes eingreift, entsprechend Formel VI.



Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ganz ergebenst für die Gewährung von Mitteln zu dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

Octacetyl-chitobiose aus Chitin.

76 g trocknes, feinst gemahlenes Chitin, welches aus Hummerschalen nach den Angaben von H. Brach²⁾ dargestellt war, wurden in ein mit Kältemischung gekühltes Gemisch von 380 ccm Essigsäure-anhydrid und 52 ccm konz. Schwefelsäure allmählich eingetragen. Darauf wurde das verschlossene Reaktionsgefäß bei Zimmer-Temperatur noch 1–2 Tage unter zeitweisem Umschütteln aufbewahrt. Dann wurde die gequollene Masse 12 Stdn. in einem Wasserbade von 50–55° erwärmt, wobei alles in Lösung ging. Nach dem Abkühlen wurde die braune Flüssigkeit in 2 l kaltes Wasser gegossen, in dem überschüssiges Natriumacetat gelöst war, um die überschüssige Schwefelsäure abzustumpfen. In dem Maße, wie sich das Gemisch erwärmte, wurde durch Einwerfen von Eisstückchen gekühlt. Nach ungefähr 2-stdg. Stehen wurde die gebildete Essigsäure mit Natriumbicarbonat neutralisiert. Dabei fiel ein Teil der Octacetyl-chitobiose in Gestalt von dunkel gefärbten Klumpen aus. Die neutrale bzw. schwach saure Lösung wurde, ohne Rücksicht auf den Niederschlag, 3-mal mit Chloroform ausgeschüttelt; die vereinigten Chloroform-Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Chlorcalcium getrocknet und im Vakuum bei 30–35° eingedampft. Der dicke Rückstand wurde mit wenig heißem Methylalkohol aufgenommen; nach längerem Stehen in der Kälte erstarrte die Lösung zu einem dicken Brei. Er wurde mit etwas Essigester angerührt, abgesaugt und mit wenig Methylalkohol nachgewaschen. Ausbeute an Rohprodukt 20 g (16.2% d. Th.). Aus der Mutterlauge ließ sich durch Einengen und Aufnehmen des Rückstandes mit Essigester noch etwas Octacetyl-chitobiose gewinnen.

Durch Umkrystallisieren aus Methanol unter Verwendung von Tierkohle gelang es, die Substanz in farblosen, winzigen, gekrümmten Nadeln zu erhalten. Schmp. 289° (korr.) unt. Zers. Die Ausbeute am 2-mal umkrystallisierten Produkt betrug 10.4 g. Die Substanz ist leicht löslich in Eisessig und Chloroform, so gut wie unlöslich in Essigester und Wasser in der Kälte. In der Wärme löst sie sich in Methylalkohol (1 Tl. Sbst. in etwa

²⁾ Biochem. Ztschr. 88, 475 [1912].

15 Tln. Lösungsmittel) und krystallisiert beim Abkühlen wieder aus. Die Substanz löst sich beim Umschütteln in $n/_{10}$ -Natronlauge und reduziert dann Fehlingsche Lösung in der Wärme. Mit Phenyl-hydrazin gibt die Octacetyl-chitobiose, ebensowenig wie das Pentacetyl-glucosamin, eine Fällung.

5.250 mg Subst. (im Hochvakuum bei 78° getr.): 9.533 mg CO₂, 2.844 mg H₂O. — 7.620 mg Subst.: 0.281 ccm N (21°, 744 mm).

C₂₈H₄₀O₁₇N₂ (676.3). Ber. C 49.68, H 5.96, N 4.14.

Gef. „ 49.52, H 6.06, „ 4.19.

$[\alpha]_D^{20} = +1.25^\circ \times 2.3867/1 \times 1.054 \times 0.0563 = +50.3^\circ$ (in Eisessig).

Molekulargewichts-Bestimmung: 0.1520 g Subst. wurden mit 100 ccm $n/_{10}$ -Natronlauge versetzt und 3 Stdn. unter zeitweiligem Schütteln stehen gelassen. Nach 1—1 $\frac{1}{2}$ Stdn. war alles in Lösung gegangen. Nach Zugabe von 20 ccm Jodlösung ($n = 0.103$) wurde 18 Min. stehengelassen. Dann wurde die Natronlauge mit der äquivalenten Menge $n/_{10}$ -Schwefelsäure neutralisiert und das ausgeschiedene Jod mit $n/_{10}$ -Natriumthiosulfat-Lösung titriert. Es waren 4.75 ccm $n/_{10}$ -Jodlösung verbraucht. Jodzahl: Gef. 31.3, Molekulargewicht: Gef. 640. Berechnet für C₂₈H₄₀O₁₇N₂: Jodzahl = 29.6, Molekulargewicht = 676.3.

Hydrolyse: Beim Verkochen des Octacetats mit verd. Salzsäure während 1 Stde. erhielten wir in guter Ausbeute salzsaures *d*-Glucosamin, das wir auch noch durch sein Pentacetat vom Schmp. 128° identifiziert haben.

Bestimmung der *O*-Acetyle: 0.5938 g Subst. wurden unter Schütteln in 100 ccm $n/_{10}$ -Natronlauge gelöst und die überschüssige Natronlauge nach 5 Stdn. mit $n/_{10}$ -Salzsäure titriert. Als Indicator diente Phenol-phthalein. Es wurden 47.50 ccm $n/_{10}$ -Salzsäure benutzt, was dem Verbrauch von 52.50 ccm $n/_{10}$ -Natronlauge entspricht. Für 6 Acetyle und das Molekulargewicht 676 wären 52.68 ccm berechnet.

Diacetyl-chitobiose aus Octacetyl-chitobiose.

2 g Octacetyl-chitobiose wurden im Laufe von 4 Stdn. unter Schütteln mit 120 ccm $n/_{5}$ -Kalilauge behandelt und dann mit 24 ccm *n*-Schwefelsäure neutralisiert. Die Lösung wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand noch 2-mal mit Methylalkohol eingedampft. Darauf wurde mit kochendem Methylalkohol 3-mal ausgezogen, die vereinigten Auszüge wurden filtriert und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in wenig absol. Alkohol gelöst und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Es entstand ein voluminöser Niederschlag; dieser wurde abgesaugt, mit etwas absol. Alkohol gewaschen und zuerst auf Ton, dann im Exsiccator getrocknet. Ausbeute = 0.3 g. Die Substanz wurde zur Analyse noch 1-mal aus absol. Alkohol umgelöst. Sie schmolz unt. Zers. oberhalb 185°. Sie löste sich mit Leichtigkeit in Wasser und schmeckte bittersüß.

5.395 mg Subst. (bei 78° im Hochvakuum getr.): 8.939 mg CO₂, 3.150 mg H₂O. — 5.019 mg Subst.: 0.287 ccm N (22°, 741 mm).

C₁₆H₂₆O₁₁N₂ (424.2). Ber. C 45.26, H 6.65, N 6.60.

Gef. „ 45.19, „ 6.53, „ 6.45.

Hexacetyl-anhydro-chitobionsäure-lacton.

5 g Octacetyl-chitobiose wurden mit 335 ccm $n/_{5}$ -Natronlauge versetzt und 3 Stdn. geschüttelt, wobei alles in Lösung ging. Dann wurden weitere 115 ccm $n/_{5}$ -Natronlauge und 330 $n/_{10}$ -Jodlösung (die Jodlösung enthält die übliche Menge Kaliumjodid) zugegeben. Die Reaktionsdauer betrug 15—20 Min. Nach Ablauf dieser Zeit wurde mit überschüssigem

Eisessig angesäuert und im Vakuum bei 40–50° eingedampft. Der Rückstand wurde zur Trocknung 2-mal mit absol. Methylalkohol eingedampft, dann mit 150 ccm Essigsäure-anhydrid übergossen, auf einem Babo-Trichter zum Sieden erhitzt (Rückfluß) und noch 5 Min. im Wasserbade auf 100° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde in 600 ccm Wasser gegossen. Nachdem das ganze Essigsäure-anhydrid zersetzt war, was ungefähr 1 Stde. dauerte, wurde die Lösung 3-mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform wurde zur Entfernung des Jods einmal mit verd. Natriumthiosulfat-Lösung, dann mit Wasser gewaschen, über Chlorcalcium getrocknet, filtriert und bei 30° im Vakuum eingedampft. Es hinterblieb ein zäher, gelblicher Sirup, der sofort zu erstarren begann. Er wurde in absol. Alkohol in der Wärme gelöst und filtriert. Beim Abkühlen des Filtrats entstand eine amorphe Fällung, welche abgesaugt und getrocknet wurde. Die Substanz sinterte bei 135° und schmolz bei 192°. Ausbeute = 0.6 g. Der Körper wurde noch 1-mal in absol. Alkohol aufgenommen, wobei ein kleiner Teil ungelöst blieb. Beim langsamen Abkühlen des Alkohols fiel das Lacton in schönen, langen Nadeln vom Schmp. 215° (korr.) aus. Es löst sich schwer in Wasser und Alkohol, leicht in Chloroform und Eisessig. In verd. Natronlauge löst es sich mit Leichtigkeit ohne Farbveränderung. Zur Analyse wurde noch 1-mal aus absol. Alkohol umkrystallisiert; Schmp. 215° (korr.).

6.264 mg Sbst. (bei 78° im Hochvakuum getr.): 11.510 mg CO₂, 3.150 mg H₂O. — 7.645 mg Sbst.: 0.334 ccm N (22°, 738 mm).

C₂₄H₃₂O₁₄N₂ (572.3). Ber. C 50.32, H 5.64, N 4.90.

Gef. „ 50.11, „ 5.63, „ 4.90.

Beim Verkochen mit konz. Salzsäure während 1–2 Min. erfolgte intensive Rotfärbung. Als dann auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Natronlauge übergossen wurde, trat starker Geruch nach Ammoniak auf.

Ozon-Spaltung des Hexacetyl-anhydro-chitobionsäure-lactons.

0.8 g Lacton wurden in 50 ccm Eisessig gelöst; dann wurde 4 Stdn. Ozon eingeleitet, die Lösung 10 Min. auf dem Wasserbade erwärmt und im Vakuum bei 40–50° verdampft. Es hinterblieb ein amorpher, glasiger Körper, der in Wasser gelöst und mit Essigsäure und Phenyl-hydrazin versetzt wurde. Es entstand sofort eine erhebliche Abscheidung glänzender Plättchen. Aus 50-proz. wäßrigem Alkohol umkrystallisiert, zeigten sie den Schmp. 184° (korr., unt. Zers.); eine Mischprobe mit dem Phenyl-hydrazid der *N*-Acetyl-oxamidsäure der voranstehenden Mitteilung hatte den Schmp. 182° (korr., unt. Zers.).