

57. Ein neuer Abbau der Glucosaminsäure.

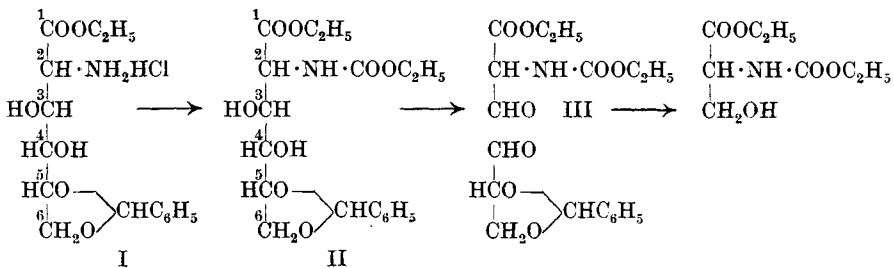
Die Konfiguration der Glucosamin- und Chondrosaminsäure

von P. Karrer und Julius Mayer.

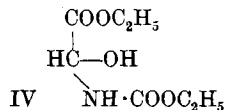
(20. III. 37.)

In einer früheren Arbeit<sup>1)</sup> hatten wir nach einem Weg gesucht, um die räumliche Stellung der Aminogruppe im Glucosamin objektiv zu ermitteln. Da jene Versuche nicht zum Ziel geführt hatten, wurde eine neue Methode des Glucosaminsäure-Abbaus ins Auge gefasst, die in folgenden Umsetzungen bestand:

Wir führten das von *Levene* und *La Forge*<sup>2)</sup> beschriebene Monobenzal-glucosaminsäure-äthylester-hydrochlorid, dem die Formel I zukommen soll, mit Chlorameisensäure-ester in den N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester (II) über und hofften, diesen zwischen den C-Atomen 3 und 4 mittelst Bleitetracetat zur Verbindung III (N-Carbäthoxy-amino-malonhalbaldehydsäure-äthylester) aufspalten zu können, dessen Reduktion zu einem Serinderivat geführt hätte:



Der oxydative Abbau des N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylesters nahm aber einen anderen Verlauf. Die Spaltung trat zwischen den C-Atomen 2 und 3 ein und als Stickstoff-haltiges Spaltstück liess sich das Glyoxylsäurederivat IV, N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-ester-ammoniak, in gut krystallisiertem Zustand isolieren. Ein Malonhalbaldehydsäure-Derivat war unter den Reaktionsprodukten nicht zu finden.

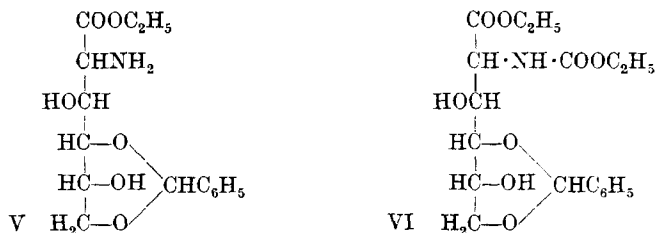


Dieser überraschende Reaktionsverlauf machte es notwendig, die Konstitution des N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-

<sup>1)</sup> Helv. **18**, 782 (1935).

<sup>2)</sup> J. Biol. Chem. **21**, 348 (1915).

äthylesters, dessen Formel I ohne Beweise aufgestellt worden war, zu überprüfen. Das Ergebnis dieser Untersuchung spricht dafür, dass das Strukturbild I durch V ersetzt werden muss:



Acetyliert man nämlich Monobenzal-glucosaminsäure-äthylester in Pyridin mit Essigsäure-anhydrid, so entsteht eine krystallisierte Triacetylverbindung, in welcher 2 Acetylreste Hydroxyle, der dritte die Aminogruppe verschliessen. In dieser Verbindung lässt sich der Benzalrest durch Erhitzen mit 60-proz. Essigsäure abspalten. Wäre Formel I diejenige des Benzal-glucosaminsäure-äthylesters, so müsste die von der Benzalgruppe befreite Acetylverbindung an den C-Atomen 5 und 6 zwei freie alkoholische Hydroxyle enthalten, und ihre Oxydation mit Perjodsäure würde zu Formaldehyd führen. Formaldehyd konnte indessen nicht erhalten werden. Aus diesem Grunde ist der Formel V für Monobenzal-glucosaminsäure-äthylester der Vorzug zu geben.

Im N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester VI stehen für den Abbau durch Bleitetracetat somit keine benachbarten Hydroxylgruppen zur Verfügung; dass die Spaltung der Molekel zwischen den C-Atomen 2 und 3, die durch ein Hydroxyl und eine acylierte Aminogruppe substituiert sind, erfolgt, ist überraschend, da nach *F. Knoop* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> Aminoalkohole durch Bleitetracetat nicht gespalten werden, wenn die Aminogruppe acyliert vorliegt; so konnten die genannten Autoren N-Benzoyl-serin  $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CH}(\text{NH}\cdot\text{COC}_6\text{H}_5)\cdot\text{COOH}$  mit Bleitetracetat nicht abbauen.

Der Oxydationsverlauf am N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester zeigt, dass jene Regel nicht allgemein zutrifft. Man könnte nun zu der Vermutung verleitet werden, dass in unserem Fall die oxydative Spaltung durch cis-Stellung von substituierter Aminogruppe (am C-Atom 2) und Hydroxyl (an C 3) erleichtert werde. Aber nicht einmal dies scheint zuzutreffen. Wie eingangs erwähnt, ist die Konfiguration der Glucosaminsäure am C-Atom 2 noch nicht streng bewiesen. Immerhin sprachen gewichtige Gründe, insbesondere das Verhalten der Glucosaminsäure-dipeptide zum Ferment Dipeptidase, das *M. Bergmann*, *L. Zervas*, *H. Rinke* und *H. Schleich*<sup>2)</sup> untersuchten, für *d*-Glucose-Konfiguration, also für trans-Stellung

<sup>1)</sup> *F. Knoop, Ditt, Hecksteden, Maier, Merz, Hürle*, Z. physiol. Ch. **239**, 30 (1936).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **224**, 33 (1934).

von  $\text{NH}_2$  und  $\text{OH}$  an den C-Atomen 2 und 3. Nach Erscheinen der Arbeit von *P. Pfeiffer* und *W. Christeleit*<sup>1)</sup>, welche die Zugehörigkeit der Aminosäuren zur *d*- oder *l*-Reihe durch Verfolgung der Rotationsdispersion der Kupfersalze und den dabei auftretenden *Cotton*-Effekt in überzeugender Weise nachweisen, haben wir das Kupfersalz der Glucosaminsäure derselben Prüfung unterzogen. Seine Rotationsdispersionskurve stimmt mit denjenigen der Kupfersalze der *d*-Aminosäure-Reihe überein<sup>2)</sup>. Der Glucosaminsäure und dem Glucosamin

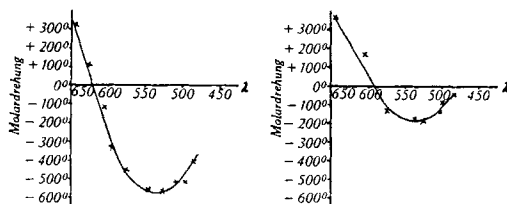


Fig. 1.

Glucosaminsaures Kupfer.

Chondrosaminsaures Kupfer.

kommt somit mit grösster Wahrscheinlichkeit die *d*-Glucose-Konfiguration zu, und die Spaltung des *N*-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylesters durch Bleitetraacetat ist zwischen transständigen  $\text{OH}$ - und acylierten Amino-gruppen vor sich gegangen. Allerdings verläuft der Abbau durch Bleitetraacetat langsam; vergleichende Messungen, die wir über den zeitlichen Verlauf der Oxydation von *N*-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester, *N*-Acetyl-monoaceton-chondrosaminsäure-lacton und Weinsäure-diäthylester durch Bleitetraacetat ausführten und die im experimentellen Teil dieser Abhandlung beschrieben sind, zeigen, wie ausserordentlich viel schneller der Abbau des Weinsäure-esters vor sich geht.

Die nun ziemlich sicher gestellte Konfiguration der Glucosaminsäure (und des Glucosamins) als *d*-Glucosekonfiguration lässt sich mit der behaupteten<sup>3)</sup> Überführung der Glucosaminsäure in (+)-Aminocaprönsäure, d. h. *l*(+)-Norleucin nicht vereinbaren<sup>4)</sup>; jene Angabe muss auf einem Irrtum beruhen. *d*-Glucosaminsäure und *d*-Glucosamin enthalten die Aminogruppe in entgegengesetzter räumlicher Lage wie die natürlichen Eiweiss-Aminosäuren, denen *l*-Konfiguration zukommt. Dasselbe scheint auch für die Chondrosaminsäure zuzutreffen, da die Rotationsdispersionskurve ihres Kupfersalzes in wässriger Lösung einen analogen Verlauf nimmt wie die-

<sup>1)</sup> *Z. physiol. Ch.* **245**, 197 (1937).

<sup>2)</sup> Da wir nur sehr verdünnte Lösungen der Kupfersalze polarimetrisch messen konnten, sind die gefundenen Drehungen nur als Näherungswerte zu betrachten.

<sup>3)</sup> *C. Neuberg*, *B.* **35**, 4014 (1903).

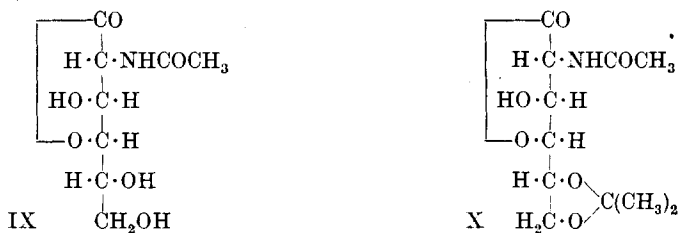
<sup>4)</sup> Vgl. dazu unsere Ausführungen *Helv.* **18**, 783 (1935).

jenige des glucosaminsauren Kupfers. Die beiden Konfigurationsformeln besitzen folgende Gestalt



Das oben erwähnte Abbauprodukt IV der Glucosaminsäure ist ein Acylderivat des Glyoxylsäure-ammoniaks und von bemerkenswerter Beständigkeit. Es lässt sich im Vakuum sublimieren. Die Einwirkung von p-Nitrophenylhydrazin auf die Substanz führt zum p-Nitrophenylhydrazon der Glyoxylsäure, Semicarbazid erzeugt Glyoxylsäure-semicarbazon und Jod oxydiert das Glyoxylsäure-ammoniakderivat zu Oxalsäure.

Für die Abbauprobe an der Chondrosaminsäure mit Bleitetracetat war ein Derivat der Chondrosaminsäure notwendig, in welchem nur noch vereinzelte Hydroxylgruppen frei sind. Nachdem Versuche, aus Chondrosaminsäure bzw. ihrem Ester mit Benzaldehyd und p-Nitrobenzaldehyd eine Monobenzal- bzw. p-Nitro-monobenzalchondrosaminsäure herzustellen, negativ verlaufen waren, gingen wir dazu über, die Chondrosaminsäure zunächst zu acetylieren. Bei der Einwirkung von Essigsäure-anhydrid auf eine wässrig-alkalische Lösung von Chondrosaminsäure entstand die N-Acetyl-Verbindung des Chondrosaminsäure-lactons, der Formel IX zukommt. Die Verbindung lässt sich aus absolutem Alkohol kristallisieren und schmilzt bei 165°.



Es ist uns nicht gelungen, aus dem N-Acetyl-chondrosaminsäure-lacton und Benzaldehyd eine kristallisierte Benzalverbindung zu erhalten, dagegen liess sich mit Aceton ein Monoaceton-Derivat darstellen. Dieses N-Acetyl-monoaceton-chondrosaminsäure-lacton der Formel X kristallisiert in verfilzten, farblosen Nadeln und schmilzt bei 164°. Über seinen Abbau mit Bleitetracetat, der wie jener des

N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylesters ziemlich langsam verläuft, ist teils vorstehend, teils im experimentellen Abschnitt dieser Abhandlung berichtet.

### Experimenteller Teil.

#### *N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester.*

3,45 g Monobenzal-glucosaminsäure-äthylester-hydrochlorid<sup>1)</sup> wurden in ca. 40 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und dann unter Eiskühlung die äquivalente Menge 10-n. Natronlauge zugesetzt. Hierauf gaben wir unter mechanischem Rühren 1,14 cm<sup>3</sup> Chlorameisensäure-ester hinzu, wobei man die Lösung durch Zugabe von festem Natriumcarbonat immer alkalisch hielt. Der N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester schied sich sogleich als in Wasser unlösliche Verbindung aus. Das Gemisch wurde noch 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, der Niederschlag abgenutscht und zur Entfernung von überschüssigem Chlorameisensäure-ester gut mit Wasser ausgewaschen. Dann wurde er in Äther aufgenommen, die Lösung mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther abdestilliert; die zurückbleibende Masse krystallisierten wir aus wässerigem Alkohol um. Smp. 129°.

C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub> N	Ber. C 56,36	H 6,58%
	Gef. „ 56,43	„ 6,61%

#### *Oxydation des N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylesters mit Bleitetracetat.*

Zu einer Lösung von 3,83 g N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester in 150 cm<sup>3</sup> warmem, thiophenfreiem Benzol gaben wir die äquivalente Menge Bleitetracetat, d. h. 4,79 g (vom Oxydationswert 92,5%). Dann wurde unter mechanischem Rühren 8 Stunden auf dem Wasserbade bei aufgesetztem Kühler erhitzt. Die Lösung war anfangs braun, wurde dann aber farblos. Im Kolben setzte sich das gebildete Bleisalz zum Teil an den Wänden ab. Nach dem Erkalten der Flüssigkeit haben wir den Niederschlag abgenutscht und mit trockenem Benzol gewaschen. Dann wurden die vereinigten Benzollösungen dreimal mit je 3 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt, wodurch sich gelöste Bleisalze und gebildete Essigsäure entfernen liessen, und hierauf die Benzollösung im Vakuum bei 25° eingedampft, wobei ein gelbes Öl zurückblieb. Dieses nahm man in Äther auf. Hierbei schied sich nochmals eine kleine Menge Bleisalz aus, welches man abfiltrierte. Die Ätherlösung wurde 30 Mal mit je 10 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt und die wässerigen Auszüge im Vakuum bei einer Temperatur von nicht über 50° zur Trockene verdampft, wobei eine farblose, in schönen Nadeln krystallisierende Substanz zurückblieb.

<sup>1)</sup> Darstellung nach *Levene* und *La Forge*, J. Biol. Chem. **21**, 348 (1915).

Diese krystallisierten wir aus wenig Wasser oder einer Mischung von Essigester und Petroläther um und trockneten im Vakuum. Die Krystalle reduzierten *Fehling'sche* Lösung und ammoniakalische Silberoxydlösung, dagegen wurde fuchsin-schweflige Säure nicht gerötet.

Zur weiteren Reinigung der Verbindung erwies es sich zweckmässig, sie im Hochvakuum zu sublimieren. Die Sublimation erfolgt im Vakuum der Quecksilberpumpe bei 60° leicht, wird aber zweckmässig bei etwas höherer Temperatur durchgeführt. So wurde das N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-äthylester-ammoniak (Formel IV) in Form einer schneeweissen Krystallmasse erhalten, die bei 87° schmilzt.

$C_7H_{13}O_5N$	Ber. C	43,95	H	6,85	N	7,33	$OC_2H_5$	47,1%
	Gef. „	43,91	„	6,75	„	7,35	„	46,8%

p-Nitrophenylhydrazon. 100 mg N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-äthylester-ammoniak wurden mit etwas mehr als der berechneten Menge p-Nitrophenylhydrazin in verdünnter Salzsäure gelöst. Das Glyoxylsäure-ester-p-nitrophenylhydrazon schied sich sogleich aus und wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 70%. Schmelzpunkt unter Zersetzung 246—248°.

$C_{10}H_{11}O_4N_3$	Ber. C	50,61	H	4,68	N	17,72%
	Gef. „	50,70	„	4,58	„	17,72%

Semicarbazon. 100 mg der Verbindung wurden mit der äquivalenten Menge Semicarbazid-chlorhydrat und Natriumacetat, welche ebenfalls in Wasser gelöst worden waren, auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten schied sich das Semicarbazon des Glyoxylsäure-äthylesters krystallisiert aus und wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Smp. 208°.

$C_5H_9O_3N_3$	Ber. C	37,72	H	5,70	N	26,41	$OC_2H_5$	28,3%
	Gef. „	38,27	„	5,63	„	26,27	„	28,67%

Titration mit Jod. 0,1010 g N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-äthylester-ammoniak verbrauchten bei der Titration nach *Willstätter-Schudel* 10,0 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Jodlösung. Ber. 10,5 cm<sup>3</sup>.

Oxydation mit Jod. 1 g N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-äthylester-ammoniak wurde in alkalischer Lösung mit etwas mehr als 2 Atomen Jod bei Zimmertemperatur oxydiert. Nach 20 Minuten haben wir die Lösung angesäuert, konzentriert und hierauf mit Äther erschöpfend extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterblieb eine weisse Krystallmasse, durchsetzt mit einem braunen Öl. Letzteres liess sich durch Digerieren mit wenig Äther weglösen. Die Krystalle schmolzen nach dem Umkrystallisieren aus Äther bei 98° und erwiesen sich nach ihren Reaktionen mit Oxalsäure identisch.

Saure Verseifung. 0,2 g N-Carbäthoxy-glyoxylsäure-äthylester-ammoniak wurden mit 8 cm<sup>3</sup> 18-proz. Salzsäure 2 Stunden zum Sieden erhitzt und die braun gewordene Lösung hierauf im Vakuum zur Trockene verdampft. Das zurückbleibende Öl wurde in

kochendem Alkohol aufgenommen. Beim Erkalten trat Krystallisation ein; die ausgefallenen Krystalle erwiesen sich als Ammoniumchlorid. Die Verseifung der Substanz führt also, wie zu erwarten stand, zur Abspaltung des Ammoniakrestes und Bildung von Ammoniumsalz.

*Triacetyl-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester.*

Man löst 2 g Monobenzal-glucosaminsäure-äthylester in 10 cm<sup>3</sup> Pyridin, gibt 3 cm<sup>3</sup> Essigsäure-anhydrid hinzu und lässt über Nacht stehen. Am anderen Tag giesst man die Lösung in natriumbicarbonathaltiges Wasser, zieht mit Äther aus und verdampft den letzteren. Dabei hinterbleibt ein Öl, das beim Anreiben mit Petroläther krystallisiert. Der so entstandene Triacetyl-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester zeigt nach 3-maligem Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol den Smp. 115°. Er ist in Alkohol leicht, in Wasser dagegen kaum löslich.

C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub> N	Ber. C 57,64	H 6,22%
	Gef. „ 57,64	„ 6,07%

Abspaltung des Benzalrestes und Oxydation mit Perjodsäure. Zwecks Abspaltung des Benzalrestes aus dem Triacetyl-benzal-glucosaminsäure-äthylester wurden 0,2185 g der Verbindung mit 8 cm<sup>3</sup> 60-proz. Essigsäure versetzt, die Flüssigkeit 12 Stunden stehen gelassen, und hierauf noch 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Danach haben wir den entstandenen Benzaldehyd im Vakuum mit Wasserdampf abgetrieben. Nun versetzten wir die zurückgebliebene Lösung, welche den entstandenen Triacetyl-glucosaminsäure-äthylester enthält, mit der berechneten Menge 0,1-molarer Perjodsäure und liessen die Mischung 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Hierauf wurde eventuell entstandener Formaldehyd in bekannter Weise im Vakuum abgetrieben und das Destillat mit Dimedonlösung versetzt. Es zeigte sich jedoch, dass kein Formaldehyd entstanden war. Der Versuch wurde 3 Mal in derselben Weise mit dem gleichen Ergebnis ausgeführt.

In einem weiteren Versuch überzeugten wir uns, dass der Benzalrest aus dem Triacetyl-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester beim Kochen mit 60-proz. Essigsäure tatsächlich sehr weitgehend abgespalten wird. Zu diesem Zweck erhitzten wir 0,2185 g des Acetylierungsproduktes des Monobenzal-glucosaminsäure-äthylesters 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad im Stickstoffstrom, fügten hierauf etwas mehr als die berechnete Menge salzsaures p-Nitrophenylhydrazin hinzu, worauf das Hydrazon des Benzaldehyds sofort ausfiel. Nach 2-stündigem Stehen wurde dieses auf einem tarierten Goochtiiegel abgesaugt und nach dem Trocknen gewogen. Ausbeute 0,0699 g Hydrazon, entsprechend 0,0324 g Benzaldehyd. Es konnten somit in dieser Weise 61,4% des theoretisch möglichen Benzaldehyds nach-

gewiesen werden. Dass die Ausbeute nicht quantitativ ausfiel, dürfte zum Teil daran liegen, dass ein Teil des Benzaldehyds sich im Stickstoffstrom verflüchtigte.

*Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeit von N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester und N-Acetyl-monoaceton-chondrosaminsäure-lacton<sup>1)</sup> durch Bleitetracetat<sup>2)</sup>.*

A) Oxydation von N-Carbäthoxy-monobenzal-glucosaminsäure-äthylester.

Die Versuche wurden folgendermassen ausgeführt: 0,3830 g der Benzalverbindung wurden in 25 cm<sup>3</sup> thiophenfreiem Benzol gelöst, mit einer genau abgewogenen Menge 99,66-proz. Bleitetracetat versetzt und eine bestimmte Zeit stehen gelassen. Dann gab man 10 cm<sup>3</sup> einer 10-proz. Kaliumjodidlösung, 3 cm<sup>3</sup> 10-proz. Schwefelsäure und 25 cm<sup>3</sup> einer 30-proz. Natriumacetatlösung hinzu und titrierte die ausgeschiedene Jodmenge mit 0,1-n. Natriumthiosulfatlösung zurück.

Angewandt: Pro Ansatz je 0,3830 g Benzalverbindung

Angewandt: Bleitetracetat

0,5045 g   0,4973 g   0,5100 g   0,4881 g   0,4931 g   0,5043 g

Es wurden bei der Rücktitration verbraucht nach

5'	30'	60'	2h	4½h	17h	
21,8 cm <sup>3</sup>	19,9 cm <sup>3</sup>	19,4 cm <sup>3</sup>	16,5 cm <sup>3</sup>	16,0 cm <sup>3</sup>	14,45 cm <sup>3</sup>	0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .

Das entspricht einem Verbrauch an Bleitetracetat von

	0,5045 g	0,4973 g	0,5100 g	0,4881 g	0,4931 g	0,5043 g
minus	<u>0,4823 g</u>	<u>0,4407 g</u>	<u>0,4296 g</u>	<u>0,3654 g</u>	<u>0,3543 g</u>	<u>0,3211 g</u>
	0,0222 g	0,0566 g	0,0804 g	0,1227 g	0,1388 g	0,1832 g
oder	5,0%	12,7%	18,1%	27,6%	31,3%	41,3%

B) Vergleich mit Weinsäure-diäthylester.

Angewandt: *d*-Weinsäure-diäthylester . . . . . 0,2333 g   0,2005 g

Angewandt: Bleitetracetat . . . . . 0,5386 g   0,5304 g

Es wurden bei der Rücktitration verbraucht

nach . . . . .	5'	15'	
	2,5 cm <sup>3</sup>	4,5 cm <sup>3</sup>	0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>

Das entspricht einem Verbrauch an Bleitetracetat von:

	0,5386 g	0,5304 g
minus	<u>0,0544 g</u>	<u>0,0997 g</u>
oder	94,4%	100%

<sup>1)</sup> Darstellung der Verbindung nachstehend.

<sup>2)</sup> Da die Oxydationsprodukte aus diesen Ansätzen nicht isoliert und identifiziert wurden, müssen wir die Frage offen lassen, ob der allmähliche Verbrauch des Oxydationsmittels vollständig auf eine einzige und einheitliche Reaktion zurückzuführen ist. Die Versuche sollen lediglich zeigen, dass der Verbrauch des Bleitetracetats sehr langsam erfolgt.



C) N-Acetyl-monoaceton-chondrosaminsäure-lacton.

Da diese Substanz in Benzol schwerlöslich ist, wandten wir als Lösungsmittel eine Mischung, bestehend aus 10 cm<sup>3</sup> Benzol und 5 cm<sup>3</sup> reinstem Dioxan an. Im übrigen wurde die Oxydation wie oben ausgeführt.

Angewandt: Pro Ansatz je 0,1300 g Chondrosaminderivat

Angewandt: Bleitetracetat

0,2665 g	0,2680 g	0,2584 g	0,2624 g	0,2768 g
----------	----------	----------	----------	----------

Es wurden bei der Rücktitration verbraucht nach

15'	1h	2h	4h	16h
9,05 cm <sup>3</sup>	8,7 cm <sup>3</sup>	7,6 cm <sup>3</sup>	7,6 cm <sup>3</sup>	7,4 cm <sup>3</sup> 0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>

Das entspricht einem Verbrauch an Bleitetracetat von

	0,2665 g	0,2680 g	0,2584 g	0,2646 g	0,2768 g
minus	<u>0,2004 g</u>	<u>0,1929 g</u>	<u>0,1685 g</u>	<u>0,1685 g</u>	<u>0,1641 g</u>
	0,0661 g	0,0751 g	0,0899 g	0,0939 g	0,1127 g
oder	29,8%	33,9%	40,6%	42,4%	50,9%

*Darstellung von Chondrosamin-chlorhydrat und Chondrosaminsäure.*

Die Herstellung dieser beiden Verbindungen geschah im Prinzip nach den Angaben von *Levene* und *La Forge*<sup>1)</sup>. Indessen wurde die Vorschrift in Einzelheiten abgeändert und verbessert, so dass wir unseren Arbeitsgang beschreiben möchten.

5,5 kg Knorpel aus der Nasenscheidewand von etwa 160 Rindern wurden von anhängendem Fleisch und Knochen befreit und durch eine Fleischmaschine gemahlen. Das Material haben wir mit 15 Liter einer heissen 2-proz. Kaliumhydroxydlösung übergossen und 5 Tage stehen gelassen. Es entstand eine dunkel-braun gefärbte Flüssigkeit, die mehrere Male durch ein feines Sieb gegossen wurde, um sie von ungelöster Substanz zu trennen. Die erhaltene Flüssigkeit wurde nun mit Essigsäure angesäuert, zur Neutralisation mit einem Überschuss von festem Bariumcarbonat versetzt und dann auf dem Wasserbad auf die Hälfte bis ein Drittel ihres ursprünglichen Volumens eingedampft. Durch diese Massnahme wird gelöstes Eiweiss ausgefällt. Die Lösung wurde nun von dem Niederschlag abzentrifugiert und in mehreren Portionen tropfenweise, unter mechanischem Umrühren, mit Bleiessig versetzt. Hierbei fiel das Bleisalz der Chondroitin-schwefelsäure aus.

Nach der Vorschrift *Levene's* soll hierauf die freie Chondroitin-schwefelsäure hergestellt werden, indem man das Bleisalz bis zur Lösung mit Essigsäure versetzt und durch weitere Zugabe von Essigsäure die Chondroitin-schwefelsäure ausfällt. Da uns dies aber nicht gelang, verarbeiteten wir das Bleisalz direkt weiter. Es wurde zu

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **26**, 147 (1916).

nächst etwa 10 Mal in Wasser suspendiert und die überstehende Flüssigkeit weggegossen. Danach wurde das Bleisalz mehrere Male mit einigen Litern Alkohol ausgewaschen und abgenutscht. Wir trockneten es bis zur Gewichtskonstanz. Ausbeute ca. 1200 g Bleisalz.

Zur Hydrolyse des chondroitin-schwefelsauren Bleies wurden je 400 g mit 100 g Bariumchlorid, 40 g Zinn(II)chlorid und 2 Liter 18-proz. Salzsäure versetzt und 12 Stunden über freier Flamme zum Sieden erhitzt. Die Lösung färbte sich hierbei schwarz, unter gleichzeitiger Ausscheidung von Bariumsulfat und dunkel gefärbten organischen Substanzen. Nach dem Erkalten wurde sie mit etwa 4 Liter destilliertem Wasser versetzt und filtriert, dann zur Ausfällung gelöster Blei- und Zinnsalze Schwefelwasserstoff eingeleitet und die Flüssigkeit wieder filtriert.

Jetzt haben wir sie im Vakuum bei 50° auf etwa 1 Liter eingedampft, zur Ausfällung gelöster Bariumsalze verdünnte Schwefelsäure hinzugegeben und wieder filtriert. Die so erhaltene, schwachgelb gefärbte Lösung wurde im Vakuum weiter eingengt, bis wir schliesslich einen dunkel-braun gefärbten Syrup erhielten. Diesen nahm man in möglichst wenig heissem Methylalkohol auf und gab vorsichtig trockenen Äther hinzu. Hierbei schied sich das Chondrosamin-chlorhydrat meistens zunächst ölig aus, wurde aber nach Kratzen mit dem Glasstab und etwa 24stündigem Stehen im Eisschrank krystallin. Die Krystalle wurden abgesaugt und mit Methylalkohol, Methylalkohol-Äther-Mischung und mit Äther ausgewaschen. Zur Reinigung haben wir die in Methylalkohol in der Hitze leicht lösliche Substanz aus diesem Lösungsmittel umkrystallisiert und die Krystallisation durch Zugabe von Äther gefördert. Wir erhielten so aus 5,5 kg Knorpel etwa 35 g fast völlig aschenfreies Chondrosamin-chlorhydrat. Das ist etwa die doppelte Ausbeute derjenigen früherer Autoren.

8 g Chondrosamin-chlorhydrat wurden in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und 60 g frisch gefälltes, in Wasser aufgeschlämmtes Quecksilberoxyd hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nun etwa 15 Minuten unter mechanischem Rühren auf dem Wasserbad erhitzt. Hierbei färbte sich die Lösung infolge Ausscheidung von Quecksilber dunkel. Wir haben sie filtriert und in die noch heisse Lösung zur Ausfällung der Quecksilberionen Schwefelwasserstoff eingeleitet. Nach abermaligem Filtrieren wurde die Lösung im Vakuum bei 50° eingengt, worauf sich nach dem Erkalten die Chondrosaminsäure abschied. Zur quantitativen Abscheidung wurde noch etwa das gleiche Volumen Alkohol hinzugegeben. Die Reinigung der Chondrosaminsäure erfolgte durch Krystallisation aus Wasser, dem man in der Hitze Äthylalkohol bis zur beginnenden Trübung zusetzte. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 30—35%.

*N-Acetyl-chondrosaminsäure-lacton.*

5 g Chondrosaminsäure werden in einer Lösung von 4 g Natriumhydroxyd in 40 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen und die Flüssigkeit auf einmal mit 7,5 cm<sup>3</sup> Essigsäure-anhydrid versetzt, wobei sie sich erwärmt. Nach 15 Minuten macht man die Lösung durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure kongosauer, dampft sie hierauf im Vakuum zur Trockene ein und trocknet den Rückstand einige Stunden bei Wasserbadtemperatur. Dann extrahiert man ihn mehrmals mit viel absolutem Alkohol, engt die vereinigten Auszüge ein und erhält so 3,5 g N-Acetyl-chondrosaminsäure-lacton.

Zur Analyse wird die Substanz 2 Mal aus absolutem Alkohol umkrystallisiert und so mit dem Smp. 165° erhalten. Da sich aus der Verbindung ein Monoacetonderivat darstellen lässt, muss in ihr ein  $\gamma$ -Lacton (Formel IX) vorliegen.

$C_8H_{13}O_6N$	Ber. C 43,81	H 5,98	N 6,40%
	Gef. „ 43,85	„ 6,13	„ 6,45%

Versuch zur Darstellung einer Benzalverbindung. 0,7 g des acetylierten Lactons wurden mit 1 cm<sup>3</sup> reinem Benzaldehyd versetzt; dazu gaben wir 5 cm<sup>3</sup> absoluten Alkohol und leiteten trockenen Chlorwasserstoff ein. Nach 3-stündigem Stehen im Eisschrank erfolgte keine Krystallisation. Beim Versetzen mit Petroläther, Äther und auch von Sodalösung schied sich kein fester Körper ab, sondern es traten nur ölige Fällungen auf. Wir fällten mit Äther ein öliges Produkt und versuchten, dieses durch mehrmaliges Digerieren mit Äther zu reinigen. Dabei verfestigte es sich schliesslich und erwies sich dann als unverändertes N-Acetyl-chondrosaminsäure-lacton.

*N-Monoaceton-chondrosaminsäure-lacton.*

0,7 g acetyliertes Lacton wurden mit 25 cm<sup>3</sup> Aceton, welches 1% Chlorwasserstoff gelöst enthielt, versetzt und die Flüssigkeit so lange geschüttelt, bis klare Lösung eingetreten war. Man liess noch 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, entfernte hierauf den Chlorwasserstoff durch Zugabe von Bleicarbonat und verdampfte das Aceton im Vakuum. Den Rückstand krystallisierten wir aus absolutem Alkohol um und erhielten das N-Acetyl-monoaceton-chondrosaminsäure-lacton in schönen verfilzten Nadeln vom Smp. 164°.

$C_{11}H_{17}O_6N$	Ber. C 50,97	H 6,61	N 5,41%
	Gef. „ 51,11	„ 6,72	„ 5,59%

Zürich, Chemisches Institut der Universität.