

Diese Ablösung findet aber erstaunlich leicht statt. Das Kation Nipenten⁺² ist z. B. eine nur um 1,4 pK-Einheiten schwächere Base als Cupenten⁺². Am besten scheint das Hexamin als hexafunktionseller Komplexpartner für das Cd⁺² zu passen, denn hier benötigt man die grösste Energie, um eine der 6 koordinierten Aminogruppen abzulösen, obschon die Haftfestigkeit von Ammoniak am Cadmium wesentlich geringer ist als am Nickel.

SUMMARY.

N, N, N', N'-Tetrakis-(β -aminoethyl)-ethylendiamine, abbreviated with „penten“, which contains 6 basic nitrogen atoms, forms metal complexes of a very high stability. The stability constants of Mn(penten)⁺², Fe(penten)⁺², Co(penten)⁺², Ni(penten)⁺², Cu(penten)⁺², Zn(penten)⁺², Cd(penten)⁺² and Hg(penten)⁺² have been determined. In the complexes of Mn, Fe, Co, Ni and Cd „penten“ functions doubtless as a hexadentate group. In spite of this fact, the complexes of these metals add protons rather easily, forming hydrogen complexes MHpenten⁺³. This is probably due to some strain within the 5 condensed chelate rings. Protons are still more easily added by the complexes of Cu, Zn and Hg, where the hexamine „penten“ functions probably as a tetradentate or a pentadentate group only. Cu(penten)⁺² and Hg(penten)⁺² can even add two protons each, forming CuH₂penten⁺⁴ and HgH₂penten⁺⁴. Some evidence is given for the existence of CuH₃penten⁺⁵, CoH₃penten⁺⁵, NiH₂penten⁺⁴, CdH₃penten⁺⁵ and HgH₃penten⁺⁵.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

75. Sur la constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique

par Kurt H. Meyer † et Gérard Baldin.

(27 II 53)

Dans un travail publié en 1948¹⁾, Kurt H. Meyer & A. Siegrist avaient proposé pour l'acide chondroïtine-sulfurique, une formule de constitution qui se distingue de la formule Ia (voir fig. 2) par une liaison osidique allant du carbonyle de la chondrosamine au C-3 de l'acide glucuronique (et non au C-4 comme dans la formule Ia). Depuis lors, quelques publications²⁾³⁾⁴⁾ ont apporté des résultats contre-

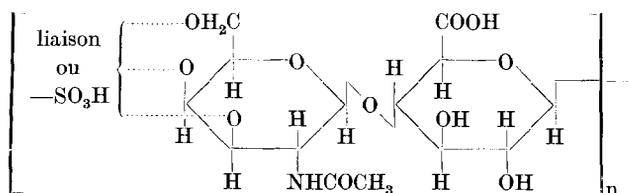
¹⁾ K. H. Meyer, M. Odier & A. Siegrist, *Helv.* **31**, 1422 (1948).

²⁾ J. Einbinder & M. Schubert, *J. Biol. Chem.* **191**, 593 (1951); **185**, 725 (1950).

³⁾ M. L. Wolfrom, R. K. Madison & M. J. Cron, *Am. Soc.* **74**, 1491 (1952).

⁴⁾ J. E. Jorpes, B. Werner & B. Aberg, *J. Biol. Chem.* **176**, 277 (1949).

disant cette formule sur certains points. En particulier, *Wolfrom* et collaborateurs¹⁾ concluent à une constitution du type ci-dessous:



Reprenant l'étude des points litigieux, à savoir: a) la liaison chondrosaminique; b) la liaison glucuronique; c) la position de l'ester sulfurique, nous avons pu confirmer les résultats de *Wolfrom* et coll. concernant la liaison chondrosaminique et préciser la position de la liaison osidique entre l'acide glucuronique et le reste chondrosaminique et qui aboutit au C-6 de ce dernier.

Extraction — Produit de départ.

La plupart des auteurs emploient lors de l'extraction une solution de KOH ou NaOH 2%. Des solutions de chlorures alcalins et alcalino-terreux ont également été employées par *Einbinder & Schubert*²⁾. Pour notre part nous avons tenté une extraction en solution aqueuse, en procédant à un autoclavage à 120°. Indépendamment de l'énorme quantité de protéines qu'il faut alors éliminer, nous avons constaté une forte dégradation du polysaccharide, mise en évidence par des recherches qualitatives à l'anthrone sur les eaux de dialyse. Les rendements se sont avérés des plus faibles. Nous avons donc préparé notre produit de départ selon la méthode de *K. H. Meyer & Siegrist*³⁾.

Poids moléculaire: Les poids moléculaires moyens chimiques ont été déterminés selon une modification de la méthode de *Willstätter & Schudel*⁴⁾, due à *Linderstroem-Lang & Holter*⁵⁾, méthode basée sur le titrage du pouvoir réducteur. Nos résultats concordent avec ceux de *K. H. Meyer & Siegrist* et sont compris entre 26500 et 30000 (au lieu de 27000—32000).

Composition de l'acide chondroïtine-sulfurique. Nous avons pu confirmer pour les teneurs en azote, en soufre et en $-\text{OCH}_3$, les indications de la plupart des auteurs en trouvant N 2,65%, $-\text{OCH}_3$ 0,0%, S 6,15%.

Les sucres composant le polysaccharide ont été identifiés comme étant la chondrosamine et l'acide D-glucuronique. On a également identifié comme composants, l'acide acétique et l'acide sulfurique.

¹⁾ *M. L. Wolfrom, R. K. Madison & M. J. Cron, Soc. 74, 1491 (1952).*

²⁾ *J. Einbinder & M. Schubert, J. Biol. Chem. 191, 593 (1951); 185, 725 (1950).*

³⁾ *K. H. Meyer, M. Odier & A. Siegrist, Helv. 31, 1422 (1948).*

⁴⁾ *R. Willstätter & G. Schudel, B. 51, 780 (1918).*

⁵⁾ *K. Linderstroem-Lang & H. Holter, Ann. Chim. Anal. 39, 116 (1934).*

Nous avons employé la chromatographie sur papier pour vérifier l'identité des sucres. Nos résultats sont conformes à ceux des auteurs précités.

Perméthylation du polysaccharide: Afin de contrôler la présence de 3 hydroxyles libres par période de disaccharide, nous avons perméthylé le polysaccharide, selon la méthode générale de *K. H. Meyer & Siegrist*¹⁾.

Tableau du dosage des méthoxyles.

Heures de méthylation	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	Théo-rique
% —OCH ₃	6,96	9,46	12,30	12,83	13,78	13,90	14,33	14,45	15,02	15,33	15,70

Nos dosages nous ont d'autre part permis de constater que la substance n'avait subi aucune perte en sulfate; le produit entièrement méthylé ne consomme pas d'acide periodique, il n'y a donc pas eu désacétylation non plus.

Liaison chondrosaminique.

Selon *K. H. Meyer & Siegrist*, la liaison chondrosaminique se trouve entre le carbone 1 de la chondrosamine et le carbone 3 de l'acide D-glucuronique. Cette conception découlait du résultat obtenu lors de l'attaque du polysaccharide natif par le periodate de Na en faible excès. La consommation très réduite en periodate excluait la présence d'un groupe glycol et militait en faveur de ce mode de liaison.

Depuis lors, *Wolfrom* et coll.²⁾ et *Einbinder & Schubert*³⁾ ont publié les résultats de travaux au cours desquels ils ont employé pour l'oxydation un très large excès de réactif. La consommation en periodate correspond alors à un groupe glycol par reste de disaccharide. La liaison chondrosamine-acide glucuronique doit donc être C₁-C₄ ou C₁-C₂, au lieu de C₁-C₃. Les résultats obtenus ensuite par *Wolfrom* et coll.²⁾ permettent de décider en faveur de C₁-C₄. En effet, en parlant de la chondrosine, ces auteurs réduisent l'ester méthylique du chlorhydrate de chondrosine en glycitol (caractérisé comme dérivé octaacétylé cristallisé). Ce glycitol est alors transformé en sa diamide par de l'ammoniaque en solution alcoolique et isolé sous forme cristallisée. L'oxydation par le periodate dégage de l'acide formique et de la formaldéhyde avec consommation rapide de 2 moles de réactif. La liaison C₁-C₂ est donc exclue.

Nous avons repris l'oxydation du polysaccharide natif, selon la méthode employée par *K. H. Meyer & Siegrist* mais en présence d'un très large excès de réactif, à pH 4,7. Les résultats obtenus montrent

¹⁾ *K. H. Meyer, M. Odier & A. Siegrist, Helv. 31, 1422 (1948).*

²⁾ *M. L. Wolfrom, R. K. Madison & M. J. Cron, Am. Soc. 74, 1491 (1952).*

³⁾ *J. Einbinder & M. Schubert, J. Biol. Chem. 191, 593 (1951); 185, 725 (1950).*

une consommation de 1 mole de réactif pour 1 mole de reste de disaccharide (fig. 1). Nous avons alors procédé au contrôle des groupements aldéhydiques formés, en les oxydant (après destruction de l'excès de periodate par le thiosulfate) au moyen d'une solution d'iode en milieu alcalin. Nous avons constaté la consommation de 4 atomes d'iode pour les 2 groupements aldéhydiques formés par le periodate. En outre après une hydrolyse totale du produit dégradé au periodate, nous avons constaté par chromatographie sur papier la présence de la chondrosamine. L'oxydation periodique est donc bien localisée sur le reste d'acide D-glucuronique, et ces résultats confirment ainsi la formule proposée par *Wolfrom* et coll.

Moles de NaIO_4
consommées par
reste de disaccharide

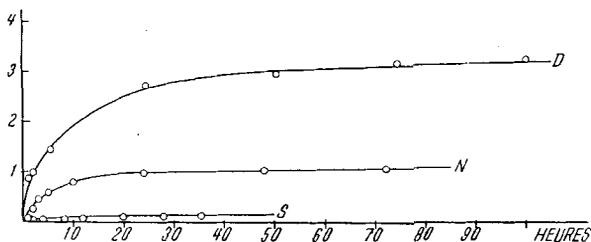


Fig. 1.

Courbes d'oxydation par le periodate

S Courbe de *K. H. Meyer & Siegrist*

N Produit natif

D Produit désulfaté et désacétylé.

Liaison glucuronique et position du reste sulfurique.

S'il était possible de désulfater et de désacétyler l'acide chondroïtine-sulfurique, on devrait obtenir un produit pour lequel on aurait le choix entre les 3 formules suivantes (fig. 2).

Ce choix pourrait être fait d'après le résultat de l'oxydation periodique. I consommerait une mole de periodate par disaccharide, alors que II en consommerait deux et III trois.

Nous avons réussi à obtenir par action de HCl 1-n. à 65°, en 80 heures, une désulfatation de 92% ± 1,5% du polysaccharide natif, en n'abaissant le degré de polymérisation que de 60 à 6 (soit 17% de liaisons glucuroniques scindées) (contrôle par titrage à l'hypoiodite). Simultanément nous avons enregistré une décarboxylation de l'acide glucuronique de 7-8%. Les dosages de l'azote amino libre selon *van Slyke*¹⁾ montrent que l'on désacétyle également totalement le polysaccharide. Nous avons ainsi pu, après l'hydrolyse, précipiter une désacétyl-chondroïtine. Pour le dosage des ions sulfuriques libérés,

¹⁾ *D. D. van Slyke*, B. **43**, 3170 (1910); *Renko-Grassmann*, Biochemisches Praktikum, p. 55.

les procédés au rhodizonate ou à la tétrahydro-quinone¹⁾²⁾ sont inutilisables ici car l'acide chondroïtine-sulfurique intact donne déjà une réaction positive. Le titrage potentiométrique est également impropre dans ce cas du fait du pH très bas de l'hydrolyse (et de la désacétylation simultanée). On peut par contre réaliser ce dosage par néphélométrie des ions SO_4^{2-} précipités comme BaSO_4 en présence de Tween 20 comme émulsifiant.

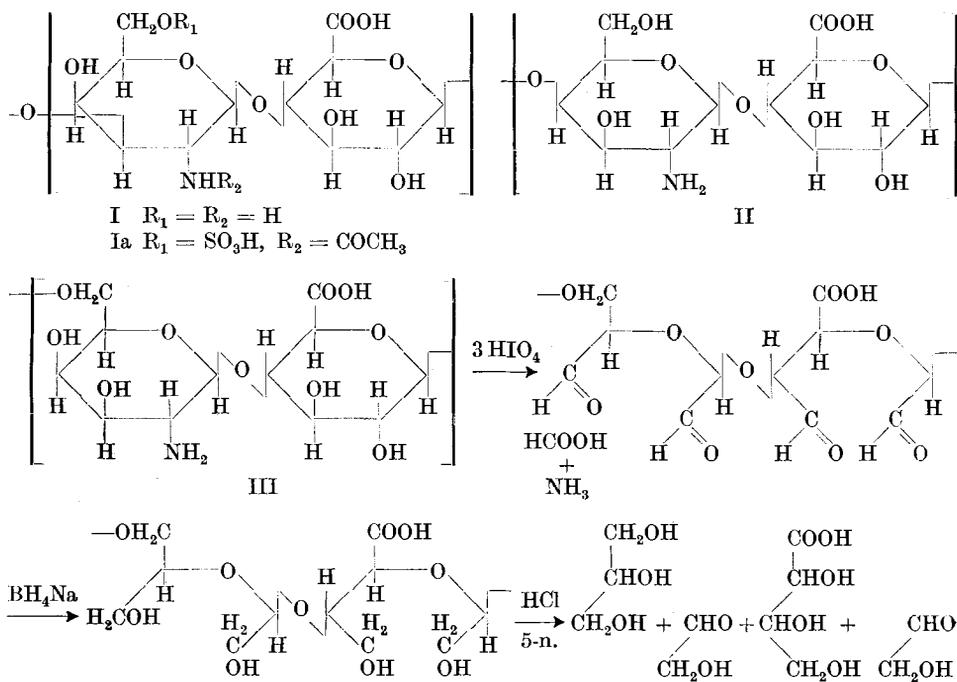


Fig. 2.

Un essai de remplacer la désulfatation hydrolytique - très lente - par une alcoololyse (HCl 1-n. éthanolique) n'a pas donné de résultat encourageant.

La désacétyl-chondroïtine soumise à une oxydation au periodate dans les mêmes conditions que le produit natif, consomme 3 moles de réactif par période de disaccharide (fig. 1, courbe D). Il y a donc 3 groupes alpha-glycols ou alpha-amino-alcool oxydables au periodate. L'un d'entre eux se trouve en C_2-C_3 de l'acide D-glucuronique; les 2 autres ne peuvent être qu'en C_2-C_3 et C_3-C_4 de la chondrosamine. De ce fait c'est la formule III qui est valable et la liaison glucuronique se trouve donc en acide D-glucuronique- C_1 -chondrosamine- C_6 . Quant au groupe sulfurique, il doit se trouver sur C_3 ou C_4

¹⁾ K. H. Meyer, M. Odier & A. Siegrist, Helv. 31, 1422 (1948).

²⁾ J. F. Alicino, Anal. Chem. 20, 85 (1948).

de la chondrosamine, sa position exacte restant encore à déterminer. Nous avons vérifié la formation, par oxydation au periodate, de 4 fonctions aldéhydiques par reste de disaccharide, en oxydant les groupes aldéhydiques formés par l'iode à pH 10,7. Effectivement, il y a consommation de 8 atomes de iode par reste de disaccharide oxydé au periodate (l'acide formique provenant du C₃ de la chondrosamine n'est en effet pas oxydé en milieu alcalin).

A l'aide de borohydrure de sodium, nous avons d'autre part réduit en alcools les groupements aldéhydiques du polysaccharide periodaté. Après l'hydrolyse totale, nous avons alors pu constater, par chromatographie sur papier, la présence du glycérol et de l'aldéhyde glycolique ainsi que d'un troisième composant qui doit être l'acide érythronique prévu (voir dernière ligne de la fig. 2).

Partie expérimentale.

1. *Extraction de l'acide chondroïtine-sulfurique.* Nous avons extrait le chondroïtine-sulfate de Na des cartilages nasaux de groins de porcs à l'aide de NaOH 2%, selon K. H. Meyer, Odier & Siegrist¹). Après élimination des protéines, dialyse et précipitation à l'éthanol, on obtient un produit qui, séché au vide poussé, donne une poudre parfaitement blanche, avec des rendements identiques à ceux des auteurs ci-dessus.

(C ₁₄ H ₁₉ O ₁₄ NSNa ₂) _n	Calculé N 2,78%	S 6,37%	-OCH ₃ 0,0%
(n ~ 60)	Trouvé „ 2,65%	„ 6,15%	„ 0,0%

Poids moléculaire: déterminé à l'aide de la méthode de Willstätter & Schudel²) par la mesure du pouvoir réducteur. Une prise de 600 mg, de polysaccharide, placée dans un erlenmeyer rôdé de 50 cm³ et dissoute dans 10 cm³ d'eau, est additionnée de 2 cm³ d'une solution de carbonate de Na à 5%. On introduit ensuite sous la surface du liquide 6 cm³ d'une solution d'iode 0,02-n. en utilisant une burette à pointe effilée (pH final 10,5—10,7). Le flacon est alors bouché et laissé 1 h. à l'obscurité à la température de la chambre. On acidifie ensuite par 2,5 cm³ d'acide sulfurique 20% et titre par le thiosulfate 0,1-n. en contrôlant la fin du titrage par l'adjonction de quelques gouttes d'une solution d'amidon à 1%. Un blanc sans polysaccharide est traité simultanément à chaque dosage.

2. *Perméthylation du chondroïtine-sulfate de sodium.* Toutes les méthylationes sont effectuées dans un ballon rôdé à 5 cols, muni de 2 entonnoirs à robinet, d'un réfrigérant à reflux, d'un tube de dégagement et d'un agitateur mécanique. Le ballon est plongé dans un bain-marie chauffé à 24° par une plaque électrique. 15 g de chondroïtine-sulfate de Na sont dissous sous forte agitation dans 300 cm³ de NaOH 1% (eau distillée bouillie). On fait passer simultanément et de façon continue un courant d'hydrogène de 2—3 bulles/sec. Une fois le sel dissous, on méthyle par introduction simultanée et progressive de 75 cm³ de sulfate de méthyle et 96 cm³ d'une solution de NaOH 30% (eau distillée bouillie). La méthylation dure 7 h. Le pH est soigneusement maintenu au-dessus de 12 (indicateur jaune d'alizarine R). La méthylation terminée, on agite encore durant ¾ h., puis précipite sous forte agitation par 1,5 litre d'éthanol 95%. Repos d'une nuit à 0°. On centrifuge, lave à l'alcool, puis à l'éther et sèche par triturations répétées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. On répète 10 fois ces opérations de méthylation et constate qu'à partir de la 5^{me} opération il faut précipiter à l'acétone. 200 mg de poudre sont prélevés à chaque étape de méthylation pour les dosages des méthoxyles.

Purification des prises: celles-ci, ainsi que le produit final, sont purifiés par 5 jours de dialyse contre de l'eau distillée légèrement alcaline (pH 8—9). On change l'eau toutes

¹) K. H. Meyer, M. Odier & A. Siegrist, *Helv.* **31**, 1422 (1948).

²) R. Willstätter & G. Schudel, *B.* **51**, 780 (1918).

les 12 h. Ensuite on concentre au vide (bain-marie, 28°) et précipite sous forte agitation par l'éthanol et 0,1 g de NaCl pour faciliter la floculation. On lave à l'alcool et à l'éther et sèche au pistolet sur P₂O₅ à la trompe à mercure. Poudre impalpable.

Dosage des méthoxyyles: selon *Vieböck*¹⁾.

3. *Chromatographie ascendante sur papier. Chromatographie des sucres du produit natif:* 1 g de chondroïtine-sulfate de Na natif est dissout dans 25 cm³ d'HCl 5-n., et chauffé 3 h. à ébullition. On concentre alors à sec au vide à 30°, puis, 3 fois de suite, reprend par 2 cm³ d'eau et évapore à sec. Le solvant suivant à phases entièrement miscibles nous a donné une séparation satisfaisante (révélateur: phtalate d'aniline)²⁾: n-butanol 3 vol.; pyridine 1,1 vol.; eau 1,5 vol. Les spots de la chondrosamine et de l'acide glucuronique ont été mis en évidence.

Mise en évidence de la chondrosamine restée intacte après traitement au periodate. Prise N° 1: 80 cm³ d'une solution de periodate 0,25-m. + 20 cm³ de tampon acétate (pH 4,7) + 1 g de polysaccharide natif, sont mélangés avec 50 cm³ d'eau. Après 50 h. de réaction, adjonction de 1,5 cm³ de glycol pour détruire l'excès de periodate, puis hydrolyser 24 h. par HCl 5-n. à ébullition; évaporer à sec à 30° au vide, puis 3 fois de suite reprendre par l'eau et évaporer. Prise N° 2: Mêmes quantités que ci-dessus mais dans l'ordre suivant: tampon + glycol + periodate, puis polysaccharide. Hydrolyser et concentrer comme décrit précédemment. — Solvant: comme pour la chromatographie des sucres; révélateur: phtalate d'aniline et ninhydrine³⁾. Spot net de la chondrosamine dans les deux cas.

Chromatographie de l'hydrolysat de la désacétyl-chondroïtine réduite et periodatée. 1 g de polysaccharide natif est désulfaté et désacétylé par 100 cm³ de HCl 1-n. à 65° pendant 80 h. Après refroidissement on ajoute 30 cm³ de tampon acétate (pH 4,7), puis 80 cm³ de periodate 0,25-m. et laisse réagir 80 h. On détruit alors l'excès de periodate par 1,5 cm³ de glycol et ramène le pH à neutralité par la soude caustique. Après adjonction de 0,4 g de borohydrure de sodium (5 fois la quantité nécessaire), on laisse réagir 24 h., puis détruit l'excès de réducteur en acidifiant à pH 4,5. On réajuste alors le pH à 7 et élimine l'acide borique par distillation avec du méthanol. La liqueur est ensuite concentrée à 50 cm³, additionnée de HCl concentré de manière à la rendre 5-n. en acide, hydrolysée par ébullition de 24 h., puis évaporée à sec à 30° au vide, et 3 fois de suite reprise par l'eau et évaporée. Solvant: comme ci-dessus; révélateur: phtalate d'aniline. Mise en évidence, par le révélateur et la lumière ultra-violette, des spots du glycérol de l'aldéhyde glycolique ainsi que d'un troisième spot qui ne peut être que celui de l'acide érythronique.

4. *Oxydations à l'acide periodique.* Elles sont effectuées à 18° car, à température plus basse et à la concentration employée du réactif, le periodate cristallise au bout de 3 h. déjà. Les prises de 200 mg placées dans un ballon jaugé de 50 cm³ sont dissoutes dans un peu d'eau. On ajoute 10 cm³ de tampon acétate de pH 4,7 (acide acétique/acétate de Na, 1:1), puis 16 cm³ (10 fois la quantité nécessaire) d'une solution de periodate de Na 0,25-m. (2,7 g de periodate dans 50 cm³ d'eau), et complète au volume par de l'eau. On laisse réagir à l'abri de la lumière. A des temps déterminés, on prélève des prises de 1 cm³ et titre en milieu acide par le thiosulfate de Na 0,1-n. en ajoutant au préalable 1 cm³ de KI 20% et ½ cm³ de H₂SO₄ 20%.

Le *chondroïtine-sulfate de Na natif* consomme 1 mole de periodate par reste de disaccharide (courbe N de la fig. 1).

Le *chondroïtine-sulfate perméthylé* ne consomme rien.

Le *désacétyl-chondroïtine* consomme 3 moles de réactif par reste de disaccharide (courbe D de la fig. 1).

5. *Oxydation ultérieure par l'hypoiodite de Na.* On détruit l'excès de periodate dans une prise aliquote, par le thiosulfate 0,1-n., alcalinise alors la prise par 22 cm³ de carbonate de Na 5% (pH 10,7) et ajoute au moyen d'une burette dont la pointe effilée plonge dans le liquide, 10 cm³ d'une solution d'iode 0,02-n. On laisse reposer 1 h. à l'obscurité à 35°

1) *F. Vieböck & A. Schwappach*, B. **63**, 2818, 3207 (1930).

2) *S. M. Partridge*, Nature **169**, 443 (1949).

3) *R. A. Boissonnas & S. Lo Bianco*, Exper. **8**, 425 (1952).

puis acidifie par 5 cm³ de H₂SO₄ 20% et titre par le thiosulfate 0,1-n. en présence d'amidon en fin de titration. Consommations trouvées: produit natif: 4,1 I/reste de disaccharide; désacétyl-chondroïtine: 8,3 I/reste de disaccharide.

6. *Désulfatation.* Nous avons hydrolysé le polysaccharide natif par HCl 1-n. à 65° et avons suivi la désulfatation au cours du temps en précipitant les ions sulfate libérés comme sulfate de Ba. Lecture du trouble au néphélomètre de *Pulfrich*, écran N° 4 et filtre vert No. 11. Nous avons constaté que le trouble de BaSO₄ (au maximum 150 γ de sulfate présents dans prise de 1,5 cm³) a tendance à se déposer dans la cuve de mesure, ce qui rend impossible les lectures. En employant un émulsifiant, le «TWEEN 20»¹⁾, produit commercial constitué principalement de mono-laurate de polyhydroxy-éthylène-sorbitane et miscible à l'eau, nous avons pu maintenir le trouble sans aucun dépôt pendant plusieurs heures. Le réactif est préparé en dissolvant dans de l'eau 50 g d'acétate de baryum et 50 g de Tween 20 dans un ballon jaugé de 500 cm³. Au bout de 2 jours la liqueur est filtrée sur gooch de porcelaine. Le réactif doit être préparé fraîchement tous les 15 jours et nous avons refait une courbe étalon à chaque nouvelle fabrication.

Courbe-étalon: 137,5 mg de sulfate d'ammonium (produit *Merck*) sont dissous dans 1 litre d'eau, soit une concentration en ions SO₄⁻⁻⁻ de 100 γ/cm³. A la prise placée dans la cuve de mesure, on ajoute 1 cm³ de HCl 1-n., 1 cm³ de polysaccharide (en solution à 1/1000), et de l'eau jusqu'à un volume de 49 cm³. On complète enfin par 1 cm³ de réactif. On prépare ainsi 5 tubes identiques pour chaque prise, allant de 20 à 170 γ. On agite alors 20 sec. avec une baguette de verre et laisse reposer 1 h. à 20°. Une fois le trouble entièrement formé on procède à la lecture (5 fois par tube). Les résultats sont parfaitement reproductibles avec une limite d'erreur de ± 1,5%.

Tableau de la courbe-étalon.

γ de SO ₄ ⁻⁻⁻	50	80	110	130	150	170
lectures (référence I/I ₀ = 40%)	25,5	36,8	46,5	53,4	58,8	66,2

Dosage proprement dit: 54 mg de chondroïtine-sulfate de Na natif sec (10 mg SO₄⁻⁻⁻) sont hydrolysés par 100 cm³ de HCl 1-n. à 65° dans un ballon jaugé bouché. Des prises de 1,5 cm³ (contenant au maximum 150 γ SO₄⁻⁻⁻) sont additionnées d'eau jusqu'à 49 cm³, puis de 1 cm³ de réactif; on agite et laisse reposer comme ci-dessus.

Dosage proprement dit.

Heures	1	2	4	6	8	10	24	48	72	96	120
lectures (référence I/I ₀ = 40%) . .	7,5	12	16,5	22,7	27,3	28,8	42,3	49,5	53,2	54,0	54,2
% de désulfatation	12,75	22,0	28,1	36,9	46,4	49,0	72,0	84,2	90,5	91,8	92,0

*Dosage des groupes amino selon van Slyke*²⁾: Les résultats enregistrés montrent que la désacétylation de l'acide chondroïtine-sulfurique est un peu plus rapide que la désulfatation; la désacétylation est complète après 80 h. d'hydrolyse par HCl 1-n.

Dosage de la scission des restes glucuroniques au cours de la désulfatation: 7,2 g de chondroïtine-sulfate de Na sec sont dissous dans 120 cm³ HCl 1-n.; le ballon, muni d'un réfrigérant à reflux, est placé dans un thermostat à 65°. On prélève des prises successives de 10 cm³. A chaque prise on ajoute 25 cm³ de carbonate de sodium 5% et 21 cm³ d'iodé 0,02-n., puis laisse reposer 1 h. à 35°. On acidifie alors par 2,5 cm³ de H₂SO₄ 20% et titre par le thiosulfate 0,1-n.

¹⁾ Atlas Powder Company.

²⁾ D. D. van Slyke, B. 43, 3170 (1910); Renko-Grassmann, Biochemisches Praktikum p. 55.

Tableau de la scission.

Heures	1	3	9	24	38
Scission en %	2,5%	4,4%	9,3%	16,7%	17,0%

Mesure de la décarboxylation du reste glucuronique. Une prise de chondroïtine-sulfate de Na est dissoute dans HCl 1-n. et placée au thermostat à 65°. On y fait passer un courant d'azote qui entraîne le CO₂ formé, dans une solution de baryte absolument limpide. On compare le trouble obtenu avec celui que donnent des solutions de Na₂CO₃ contenant des quantités connues de CO₂. Résultat: décarboxylation de 7—8% au bout de 90 h.

RÉSUMÉ.

Reprenant l'étude de la constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique, nous avons pu établir:

1° Que la liaison chondrosaminique se trouve bien en C₁—C₄, conformément aux conclusions de *Wolfrom*.

2° Que la liaison glucuronique se trouve en C₁—C₆ et non pas C₁—C₃.

3° Que le groupe sulfate est situé en C₃ ou C₄ de la chondrosamine.

Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève.

76. Neue Synthese des Dihydro-desoxycodeins

von P. Karrer und R. Saemann.

(28. II. 53.)

Durch Tosylierung von Codein und Reduktion des Codein-toluolsulfonsäureesters wurde vor einiger Zeit Desoxycodein E = A⁷-Desoxycodein hergestellt¹⁾. Später ist die Verbindung auch von *H. Rapoport & R. M. Bonner* auf demselben Weg erhalten worden²⁾. Wir beschreiben im folgenden eine einfache Darstellungsmethode für Dihydro-desoxycodein (II), das unter der Bezeichnung Dihydro-desoxycodein D (früher Dehydroxy-dihydro-codein³⁾) schon länger bekannt ist.

Aus Dihydro-codein⁴⁾ wurde der p-Toluolsulfonsäureester (I) hergestellt; er lässt sich am besten über das kristallisierte Tartrat rein-

1) *P. Karrer & G. Widmark*, *Helv.* **34**, 34 (1951).

2) *Am. Soc.* **73**, 2872 (1951).

3) *C. Mannich & H. Löwenheim*, *Arch. Pharm.* **258**, 311 (1920).

4) *C. Mannich & H. Löwenheim*, *Arch. Pharm.* **258**, 304 (1920). — *M. Freund*, *J. pr.* **101**, 12 (1921).