

Beiträge zur Constitution des Chitins

von

Dr. **Sigmund Fränkel** und Dr. **Agnes Kelly** (Adelaide).

Aus dem chemischen Laboratorium des Hofrathes Prof. Ad. Lieben an der
k. k. Universität in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. December 1901.)

Die Chemie des Chitins ist seit dem Momente in den Vordergrund des Interesses der physiologischen Chemiker getreten, als man die ungeahnte Verbreitung von dem Chitin nahe verwandten Substanzen und Derivaten in verschiedenen thierischen Geweben gefunden und den Nachweis erbringen konnte, dass die Eiweißkörper dem Chitin nahestehende stickstoffhaltige Kohlehydrate als Seitenketten ihres großen Molecüls tragen. Nach dieser Richtung hin verdienen Erwähnung die Untersuchungen von Schmiedeberg über Knorpel,¹ die Abspaltung von Chitosamin oder einem Isomeren desselben aus Eiweiß,² ferner die Arbeit von J. B. Leathes,³ welchem es gelang, aus dem Ovarialmukoide eine Biose zu isolieren, die anscheinend aus Chitosamin und einem stickstofffreien Zucker zusammengesetzt ist, schließlich die Abspaltung des Dichtosamins, Albumin genannt, aus Eiweiß mittels Barythydrat.⁴

Über das Chitin selbst war bis nun nur bekannt, dass es beim Kochen mit rauchender Salzsäure das schön kristallisierende Chitosaminchlorhydrat, ferner etwas Essigsäure und Aceton liefert. Auf Grund dieser Spaltung, welche wir

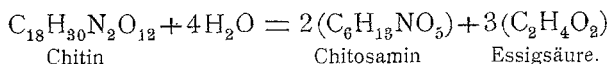
¹ Arch. für exp. Path. und Pharm., Bd. 28.

² Leo Langstein, Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 31; Seemann, Inaugur.-Diss. Marburg 1898 und Arch. für Verdauungskrankheiten, Bd. IV.

³ Arch. für exp. Path. und Pharm., Bd. 43.

⁴ S. Fränkel, Monatshefte für Chemie, Bd. XIX.

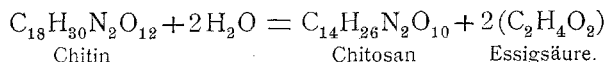
Ledderhose verdanken,¹ und der zahlreichen Analysen des Chitins, von verschiedenen Autoren ausgeführt, wurde es von Schmiedeberg² als eine α -Acetylacetessigsäureverbindung des Chitosamins aufgefasst, aus welcher nach folgender Gleichung Chitosamin und Essigsäure entsteht.



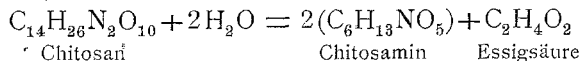
Diese Formel für Chitin stimmt mit den meisten bekannten Analysen gut überein, und Schmiedeberg meinte, dass diejenigen Präparate, welche weniger C ergaben, als eine solche Formel verlangt, wohl noch ein Molecül Wasser enthalten.

Aus dem Folgenden wird sich ergeben, dass dem Chitin keineswegs die angenommene einfache Zusammensetzung zukommen kann.

Auf dieser Erklärung Schmiedeberg's aber fußen Araki's³ Erklärungen der Zusammensetzung und des Aufbaues des Chitosans, welches nach folgender Gleichung durch Einwirkung von schmelzendem Kali aus Chitin entstehen soll.



Aus dem Chitosan wird nun durch Einwirkung rauchender Salzsäure Chitosamin und Essigsäure nach der Gleichung:



gebildet.

Da durch Spaltung mit rauchender Salzsäure in der Hitze nur Endproducte, aber keine Zwischenproducte zu fassen waren, welche uns Aufschlüsse über den Aufbau des Chitins geben konnten, namentlich Aufschlüsse, welche sich darauf beziehen mussten, in welcher Weise die Essigsäuregruppen mit dem stickstoffhaltigen Kohlehydrat, das dem Chitin zugrunde

¹ Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 1 und Bd. 2, 213; Bd. 4, 139.

² A. a. O.

³ Araki, Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 20, 498.

liegt, verbunden sind, sahen wir uns veranlasst, das Studium des Chitins nach anderen Methoden aufzunehmen, in der Hoffnung, zu Derivaten zu gelangen, aus denen sich die gewünschten Schlüsse ziehen lassen würden.

Krukenberg¹ gab an, dass sich Chitin in concentrirten Mineralsäuren in der Kälte löst und durch Verdünnung der Lösung mit Wasser wieder unverändert ausgefällt werden kann. Vor ihm hatte Bütschli² Untersuchungen nach dieser Richtung angestellt, welcher durch Einwirkung von concentrirter Schwefelsäure auf Chitin in der Kälte eine Lösung dieser Substanz erhielt, welche beim Verdünnen mit Wasser nur eine geringe Fällung zeigte. Durch Präcipitieren dieser Lösung mit Alkohol gelangte Bütschli angeblich zu stickstofffreien Zuckern, die im Gegensatze zum Chitin auch keine Jodreaction mehr zeigten. Berthelot³ erhielt durch Kochen mit Schwefelsäure einen gährungsfähigen Zucker, während Chitosamin nicht gährt. Ledderhose meinte nun, dass Schwefelsäure ähnlich wirke wie Salzsäure, dass aber durch sie aus dem Chitosamin die NH_2 -Gruppe abgespalten und so gährungsfähiger Zucker entsteht, was nach unseren heutigen Kenntnissen des Chitosamins ja gar nicht möglich ist.

Wir studierten nun nach mannigfachen Vorversuchen die Spaltung des Chitins mit concentrirter Schwefelsäure in der Kälte und kamen zu durchaus anderen Resultaten, welche ein neues Licht auf den Aufbau des Chitins werfen und welche auch die Resultate der anderen Forscher auf diesem Gebiete erklären.

Experimentelles.

Sorgfältig gereinigtes, fast aschefreies Chitin wurde mit 70 bis 72% Schwefelsäure bei Zimmertemperatur in fein gepulvertem Zustande etwa durch zwei bis drei Tage behandelt. Die Flüssigkeit färbt sich immer und riecht nach Aceton. Beim Abbrechen des Versuches wurde die Schwefelsäure in etwa die

¹ Zeitschr. für Biologie, Bd. 22.

² Dubois, Arch. für Anat. und Physiol., 1874.

³ Comptes rendus, 47.

fünffache Menge eiskalten destillierten Wassers langsam gegossen und von dem nicht angegriffenen Chitin hierauf abfiltriert. Das Filtrat reducierte alkalische Kupferlösungen, und zwar in allen Versuchen.

Nun wurde die Lösung mit Barythydrat oder Baryumcarbonat neutralisiert. Das Filtrat erwies sich trotz der neutralen Reaction auch nach dem Erwärmen barythältig, weshalb es nach dem Concentriren im Vacuum mit Ammoniumcarbonat alkalisch gemacht wurde. Vom Baryumcarbonat wurde wiederum abfiltriert und das Filtrat neuerdings im Vacuum eingeeengt. Die Flüssigkeit enthielt nunmehr Spuren von Baryt und Kalk.

Die klare, schwach gefärbte Flüssigkeit wurde mit dem gleichen Volum 96% Alkohol versetzt, wobei eine starke Fällung entstand (Fraction I). Das Filtrat wurde mit drei Volum Alkohol gefällt (Fraction II). Das Filtrat wurde nun mit Äther, und zwar mit dem halben Volum versetzt, wobei ein leichtes Präcipitat ausfiel (Fraction III). Die alkoholisch-ätherische Lösung wurde sich selbst überlassen, und es setzte sich beim längeren Stehen am Boden eine viscöse Masse ab (Fraction IV). Die darüberstehende alkoholisch-ätherische Lösung wurde nun verdunstet und der Rückstand krystallisierte (Fraction V).

Dieselbe krystallisierende Substanz, Fraction V, erhielten wir bei weiteren Versuchen in der Weise, dass wir die Lösung der Spaltungsproducte des Chitins, nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt, mit Methylalkohol fällten. Es wurden auf ein Volum Flüssigkeit vier Volum absoluten Methylalkohols verwendet, das Filtrat mit dem gleichen Volum Äthylalkohol gefällt; bei vorsichtigem Zusatz von Äther zum Filtrate nach der Fällung mit Äthylalkohol fiel vorerst eine Schmiere aus, nach Zusatz von mehr Äther zum Filtrat krystallisierte die Substanz heraus.

Diese Substanz (Fraction V der ersten Versuchsreihe) wurde aus siedendem Methylalkohol umkrystallisiert.

Die schön in millimeterlangen Nadeln krystallisierende Substanz reagiert neutral, gab beim Zusammenbringen mit Mineralsäuren keine Salze, reducierte Kupferoxyd in alkalischer

Lösung kräftig, gab aber kein Phenylhydrazinderivat beim Kochen ihrer Lösung mit essigsauerm Phenylhydrazin.

Sie ist leicht löslich in Wasser; in reinem Zustande ziemlich schwer löslich in Methyl- und Äthylalkohol, leichter in letzterem. Unlöslich in Äther.

Der Schmelzpunkt der Verbindung war nicht scharf, bei 190° schmolz sie unter Zersetzung.

Die Elementaranalyse der aus Methylalkohol umkrystallisierten, bei 110° getrockneten Substanz ergab folgende Werte:

- I. 0·1552 g gaben $V = 8\cdot99$, $t = 19\cdot8$, $B = 766$, d. i. 0·0107 g N oder 6·64% N.
 II. 0·1848 g gaben 0·2950 g CO₂ und 0·1174 g H₂O, entsprechend 43·50% C und 7·03% H.
 III. 0·1842 g gaben 0·2942 g CO₂ und 0·1177 g H₂O, entsprechend 43·65% C und 7·11% H.
 IV. 0·1552 g gaben $V = 9\cdot23$, $t = 24\cdot4$, $B = 766$, entsprechend 6·66% N.

In 100 Theilen:

	Für Monoacetyl- chitosamin berechnet	Gefunden	
		I	II
C	43·44	43·50	43·65
H	6·78	7·03	7·11
N	6·34	6·64	6·66

Da die Elementaranalysen auf ein acetyliertes Chitosamin hinwiesen, wurde eine Acetylbestimmung nach Wenzel¹ ausgeführt.

Sie ergab folgendes Resultat:

0·3190 g Substanz gaben 0·0649 g Acetyl.

In 100 Theilen:

Berechnet für Monoacetylchitosamin	Gefunden
19·45	20·35

¹ Monatshefte für Chemie, 1897, S. 659.

Die Drehungsbestimmung der Substanz wurde mit dem großen Lippich'schen Polarisationsapparat ausgeführt und ergab folgende Werte:

0·3725 g, in 20 cm^3 Wasser gelöst, zeigten 0·78° Rechtsdrehung im 1 dm-Rohr. Berechnet für $\alpha_D = +41\cdot86^\circ$.

Das Resultat der Elementaranalysen, sowie das der Acetylbestimmung war nur dahin zu deuten, dass wir es mit einem monoacetylierten Chitosamin zu thun haben, und es ergab sich nun die Nothwendigkeit, zu untersuchen, welche Stellung die Acetylgruppe einnimmt. Schon die neutrale Reaction, sowie der Umstand, dass mit Mineralsäuren keine Salzbildung eintrat, sprachen dafür, dass hier ein am Stickstoff acetyliertes Chitosamin vorliegt. Wir waren aber in der angenehmen Lage, den Beweis auch weiter führen zu können, da ein synthetisch dargestelltes Monoacetylchitosamin bereits bekannt war.

Breuer¹ hatte ein solches aus dem von ihm dargestellten freien Chitosamin in der Weise erhalten, dass er letzteres in absolutem Methylalkohol löste und die Lösung mit einem Überschuss von Essigsäureanhydrid mehrere Stunden stehen ließ. Sein Acetylchitosamin krystallisierte in langen dicken Nadeln aus, löste sich leicht in Wasser und in kochendem Methylalkohol; es bräunt sich beim Erhitzen über 150° und bei circa 190° zersetzt es sich ohne scharfen Schmelzpunkt; also Verhältnisse, welche völlig analog sind mit denen unserer Substanz.

Wir verdanken Dr. Breuer eine Quantität freien Chitosamins, welche uns in die Lage versetzte, sein Monoacetylchitosamin synthetisch herzustellen und mit unserem Präparate eingehend zu vergleichen. Während die Lösungsverhältnisse und der Schmelzpunkt identisch waren, ergab die Drehungsbestimmung eine kleine Differenz, welche wohl dadurch zu erklären ist, dass Acetylchitosamin ebenso wie salzsaures Chitosamin bei verschiedener Concentration etwas abweichende Drehungswerte zeigt.

Das synthetische Präparat gab folgendes Resultat:

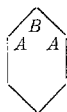
¹ Berl. Ber., Bd. 31, II, 2898.

0.2342 g, in 15 cm^3 Wasser gelöst, zeigten 0.62° Rechtsdrehung im 1 dm-Rohr, daher $\alpha_D = +39.71^\circ$, während, wie erwähnt, Acetylchitosamin aus Chitin $\alpha_D = +41.86^\circ$ zeigte.

Wir haben nun sowohl die synthetischen, als auch die aus Chitin erhaltenen Krystalle krystallographisch untersucht und miteinander verglichen.

Synthetisches Acetylchitosamin.

Form nadelförmig, viele flache Platten, wie in der Zeichnung. Beim Messen der Winkel A und B zeigte es sich, dass sie ganz constant waren. A annähernd 114° , B 132° .



Farblos, Brechungsvermögen etwas höher als das des Cedernöls, und zwar 1.52. Geringe Doppelbrechung, Farben erster und zweiter Ordnung, letztere viel seltener als erster Ordnung. Manche Nadeln zeigen einen positiven Charakter in Bezug auf die Längsaxe der Krystalle, andere wiederum sind negativ. Die Auslöschung ist nicht vollkommen. Die Interferenzfigur ist zweiaxig. Es ist charakteristisch für die Krystalle, dass der Austritt der optischen Axe senkrecht oder fast senkrecht zur Oberfläche der plattenförmigen Krystalle ist und der Balken senkrecht oder fast senkrecht zur Längsaxe der Krystalle läuft. Schlussfolgerung: Die Krystalle sind monoklin.

Acetylchitosamin aus Chitin.

Nadelförmige Form, kleiner als die synthetischen Krystalle. Flache Platten sind selten, Krystalle mit den Winkeln A und B sind selten gut entwickelt. Farblos, das Brechungsvermögen ist auch höher als das des Cedernöls, es scheint öfters höher zu sein als das der synthetischen Krystalle, aber wahrscheinlich scheint es nur so, weil die Krystalle nicht so dünn sind. Doppelbrechung gering, erster und zweiter Ordnung. Die Krystalle sind öfters +, manchmal —, parallel zur Längsaxe. Die

Auslöschung ist nicht vollkommen. Die Interferenzfigur wie in den synthetischen Krystallen. Es ist durch die größere Unregelmäßigkeit in der Lage der Krystalle bedingt, dass es möglich ist, manchmal eine Interferenzfigur zu beobachten, in welcher die zweite Mittellinie senkrecht oder fast senkrecht auf die Oberfläche der Krystalle ist.

Wir schließen aus allen diesen Untersuchungen, dass unsere Substanz identisch ist mit dem synthetischen Acetylchitosamin. Nun ergibt sich aber für letzteres aus der Synthese in alkoholischer Lösung und in der Kälte aus Chitosamin und Essigsäureanhydrid der sichere Schluss, dass es am Stickstoff acetyliertes Chitosamin ist.

Wir führen daher als beweisend für den Umstand, dass wir ein am Stickstoff monoacetyliertes Chitosamin als Spaltungsproduct des Chitins isoliert haben, folgende Punkte an:

Die neutrale Reaction, Chitosamin selbst reagiert alkalisch. Das Fehlen der salzbildenden Kraft und die Synthese der identischen Substanz aus Chitosamin und schließlich noch folgenden negativ ausgefallenen Versuch:

Nach Lobry de Bruin und van Eggenstein¹ erhält man bei Acetylierung von salzsaurem Chitosamin durch kurzes Kochen mit Natriumacetat und Essigsäureanhydrid glatt zwei isomere Pentaacetate, eines mit dem Schmelzpunkte 183.5° , das andere 133° . Wäre unser Acetylchitosamin aus Chitin nicht am Stickstoff acetyliert, so hätte sich bei gleicher Behandlung aus demselben ein Pentaacetylchitosamin, wie das von Lobry de Bruin, darstellen lassen müssen. Bei dem Versuche aber, in gleicher Weise Acetylchitosamin zu behandeln, erhielten wir lediglich eine syrupöse Masse, welche auf keine Weise zur Krystallisation zu bringen war.

Durch den Fund des Monoacetyl-*n*-Chitosamins ist die Stellung der Acetylgruppe im Chitin erklärt, und der Aufbau dieser Substanz wird nun durchsichtiger.

¹ Rec. des travaux chimiques des Pays-Bas, 1883.

Unter den Spaltungsproducten, welche wir in verschiedenen Fractionen isoliert haben, ist es uns bis jetzt gelungen, eine zweite zu finden, welche ebenfalls von Interesse für den Aufbau des Chitins und des Chitosans ist und insbesondere zeigt, dass die Auffassung des Chitins und des Chitosans als einer Biose, die mit drei Acetylgruppen oder einer Biose mit einer Acetylacetessigsäure, respective Essigsäure combinirt ist, unzulässig erscheint.

Wir haben nämlich unter den Spaltungsproducten eine Substanz isoliert, welche wir für Monoacetyldichitosamin halten, und die mit dem Chitosan Araki's durchaus nicht identisch ist. Die wässrige Lösung der Chitinzeretzungsproducte, in beschriebener Weise gewonnen, wurde mit vier Volum Methylalkohol versetzt und das Filtrat mit dem gleichen Volum Äthylalkohol gefällt. Das Präcipitat wurde wieder in Wasser gelöst und nun vorsichtig mit Alkohol fractionirt gefällt. Wenn man mit Alkohol sehr vorsichtig versetzt, erhält man zuerst schmierige Ausscheidungen, später aber bei reichlicherem Zusetzen von Alkohol einen ungemein voluminösen, amorphen Niederschlag. Dieser Niederschlag wurde mehrmals gelöst und gefällt und zeigte folgende Eigenschaften:

Die Substanz zeigte keine Reduction alkalischer Kupferlösung, keine Reaction mit Jod, welche das angeblich die gleiche Zusammensetzung besitzende Chitosan zeigt; sie gibt keinen Niederschlag mit neutralem oder basischem Bleiacetat.

Während Chitosan absolut unlöslich in Wasser und Lauge ist, zeigt unser Acetyldichitosamin leichte Löslichkeit, Chitosan aber ist nur in verdünnten Säuren löslich und wird aus diesen Lösungen durch Alkali wieder gefällt. Chitosan dreht in essigsaurer Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach links, unsere Substanz nach rechts. Dieselbe Substanz erhielten wir durch Fällen der Lösung mit Äthylalkohol und Zusatz von Äther zum Filtrat. Die wieder in Wasser gelöste Fällung wurde mit Alkohol-Äther wiederholt präcipitirt und zur Reinigung mit Äthyl- und Methylalkohol ausgekocht, um es von Acetyldichitosamin, der reducirenden Substanz, zu befreien.

Die Elementaranalysen zeigen Werte, deren Durchschnitt mit der Formel $C_{14}H_{26}O_{10}N_2$ übereinstimmt.

Der eine von uns ist mit dem weiteren Studium dieser Substanz, deren Reindarstellung auf große Schwierigkeiten stößt, sowie mit der Untersuchung der in den übrigen Fractionen der Chitinspaltungsproducte enthaltenen Substanzen beschäftigt und wird demnächst über diesen Gegenstand weitere Mittheilungen machen.

Aus den bis nun vorliegenden Untersuchungen lässt sich der Schluss ziehen, dass die Grundlage des Chitins Acetyl-*n*-Chitosamin ist und die Auffindung des Acetyldichitosamins zeigt, dass das Chitin und Chitosan keineswegs die angenommene einfache Zusammensetzung besitzen, sondern vielmehr höher zusammengesetzte stickstoffhaltige, am N acetylierte, respective mit Acetylacetessigsäure verbundene Polysaccharide sind, deren Analogie mit Stärke und Glykogen sich auch in der Jodreaction kund gibt, welche den tieferen Spaltungsproducten, den Monosen und Biosen fehlt. Es wird daher, wie wir in den weiteren Mittheilungen zeigen werden, die Formel des Chitins zu vervielfachen sein.
