

betrifft, haben *Orloff*, *Kolka*, *Calingaert*, *Griffing* und *Kerr*² den Buchstaben η benutzt. In einer Arbeit aus dem Jahre 1949³, in der über die Strukturbestimmung der damals bekannten fünf Benzolhexachloride und auch des Hexachlorcyclohexans von Schmp. 145° mittels Elektronenbeugung berichtet wurde, wurde außer der Festlegung der Struktur der α -, β -, γ -, δ - und ε -Benzolhexachloride ausdrücklich betont, daß die 145°-Verbindung *kein* Benzolhexachlorid sein konnte.

In 1950 haben *Ellefsen*, *Wang Lund* und *Hassel*⁴ aus den Röntgen- daten und den Elektroneninterferenz- aufnahmen gezeigt, daß die Struktur der 145°-Verbindung der Konfiguration 1 ea, 2 e, 4 ea, 5 e (1 $\kappa\varepsilon$, 2 κ , 4 $\kappa\varepsilon$, 5 κ) entspricht. (Aus den Elektronenbeugungsversuchen konnte sogar festgestellt werden, daß diese Konfiguration und nicht die „umgeklappte“ die energetisch stabilere Form ist.) Unabhängig davon ist *Riemschneider*⁵ durch rein chemische Versuche zu dem Ergebnisse gelangt, daß die Verbindung 1,1,2,4,4,5-Hexachlorcyclohexan ist.

Aus den oben dargelegten Gründen erscheint es uns vielleicht be- rechtigt, wie es von *Riemschneider* und Mitarbeitern vorgeschlagen worden ist, dem Benzolhexachlorid vom Schmp. 90° die Bezeichnung ζ -Isomeres zuzuteilen.

Darstellung hochviskoser Hyaluronsäure.

(Kurze Mitteilung.)

Von

W. Frisch-Niggemeyer.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.

(Eingelangt am 8. Jan. 1954. Vorgelegt in der Sitzung am 28. Jan. 1954.)

Bei hochpolymeren Naturstoffen, zu denen auch die Hyaluronsäure gehört, ist eine Depolymerisation durch den Darstellungsvorgang nach Möglichkeit zu vermeiden. Die spezifische Viskosität derartiger Ver- bindungen wird als Anhaltspunkt für deren Polymerisationsgrad gewertet¹. Durch besonders schonende Extraktions- und Enteiweißungsmethoden

² *H. D. Orloff*, *A. J. Kolka*, *G. Calingaert*, *M. E. Griffing* und *E. R. Kerr*, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4243 (1953).

³ *O. Bastiansen*, *O. Ellefsen* und *O. Hassel*, *Research* **2**, 248 (1949).

⁴ *O. Ellefsen*, *O. Hassel* und *E. Wang Lund*, *Acta Chem. Scand.* **4**, 1145 (1950). — Vgl. *O. Hassel*, *Research* **3**, 504 (1950).

⁵ *R. Riemschneider*, *Z. Naturforsch.* **6** b, 48, 339 (1951); *Chem. Abstr.* **45**, 7856 b (1951).

¹ *Z. Hadidian* und *N. W. Pirie*, *Biochemic. J.* **42**, 260 (1948).

² *A. M. Marko* und *G. C. Butler*, *J. Biol. Chem.* **190**, 165 (1951).

ist es uns gelungen, aus menschlichen Nabelschnüren Hyaluronsäure mit einer spezifischen Viskosität von zirka 6,9 darzustellen. Extrahiert wurde mit 0,5-m Kochsalzlösung und enteiweißt mit einem synthetischen Mersolat („Teepol“ von *Shell*) nach einer Modifikation der von *Marko* und *Butler*² für Nukleinsäure ausgearbeiteten Methode.

Methodik.

Menschliche Nabelschnüre werden gut gewaschen und in Aceton eingelegt. Unser Ausgangsmaterial lagerte so zirka zwei Monate. Die Schnüre werden in zirka 1 cm lange Stücke geschnitten und gut mit kaltem Wasser gewaschen. Das Waschwasser wird verworfen. Sie werden dann zuerst durch eine Fleischmaschine und hierauf durch einen Fleischwolf gedreht. Die schleimige Masse wird nun mit dem 4fachen Volumen 0,5-m Kochsalzlösung versetzt und 48 Stdn. bei 0° C extrahiert. Es wird zentrifugiert und das Sediment im doppelten Volumen Wasser suspendiert und 12 Stdn. bei 0° C stehen gelassen. Abermals wird zentrifugiert, das Sediment verworfen und die überstehenden Lösungen vereinigt. Diese werden mit einer Mischung von „Teepol“ und Wasser im Verhältnis 1 : 1 versetzt, so daß das gesamte Volumen 3% handelsübliche „Teepol“-Lösung enthält. Nun fügt man 1½ Volumen konzentrierter Kochsalzlösung zu, die im Liter 50 g „Hyflo Super Cel“ enthält. Es werden dann noch weitere 10 g „Hyflo“ je Liter zugesetzt, und die Suspension wird mittels Vakuum filtriert. Der Rückstand wird verworfen und das Filtrat wird in das gleiche Volumen gut gekühlten Alkohols gegossen. Hierbei fällt neben der Hyaluronsäure auch Kochsalz aus. Um von diesem zu trennen, verfährt man so, daß man die Hyaluronsäurelösung in dünnem Strahl in den Alkohol gießt, während man mit einem Glasstab umrührt. Die Säure fällt in Fäden aus, die zuerst klebrig sind und sich als weiße Spule am Glasstab ansetzen. Das Kochsalz setzt sich zum größten Teil am Boden des Gefäßes ab. Man löst nun die Säure in Wasser, und zwar in ¼ des Volumens des ersten Filtrats, und wiederholt die Alkohol-fällung. Neuerliches Lösen in Wasser und Fällen mit dem doppelten Volumen gekühlten Acetons beschließt die Reinigung. Die Hyaluronsäurespule wird unter Aceton in möglichst kleinen Fasern vom Glasstab abgelöst und diese mit reinem Aceton gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet.

Wir erhielten auf diese Weise aus 1½ kg Nabelschnüren zirka 1 g Hyaluronsäure. Es ist anzunehmen, daß durch öftere Extraktion die Ausbeute verbessert werden kann.

Ergebnisse.

Das Endprodukt hat eine faserige, asbestähnliche Beschaffenheit. Der Stickstoffgehalt — nach *Kjeldahl* — war 3,9%. Die Biuretreaktion einer 1%igen Hyaluronsäurelösung war negativ. Viskositätsmessungen wurden mit einem *Ostwald*-Viskosimeter mit einer Durchlaufzeit für Wasser von 114 Sek. bei 20° C durchgeführt. Bei pH 7,0 ergab eine Messung in 0,06-m Phosphatpuffer eine relative Viskosität von 6,9. Messungen in Veronal-Natrium-Salzsäure-Puffer unter sonst gleichen Bedingungen erbrachten eine relative Viskosität von 6,6.

Diskussion.

In einer Übersicht von *Pantlitschko*³ sind für Hyaluronsäure verschiedene spezifische Viskositäten angegeben. Die Werte liegen für acht verschiedene Darstellungsvorschriften zwischen 1,16 und 4,3. Eine Ausnahme macht die Angabe von *Hadidian* und *Pirie*¹. Diese Autoren konnten durch ein etwas umständliches Verfahren durch Extraktion mit Wasser bzw. Kochsalzlösung, Säurefällung, enzymatische Verdauung, Alkohol- oder Ammonsulfatfällung und schließlich durch Enteiweißung mit Chloroform Alkohol nach *Sevag* ein Produkt mit einer spezifischen Viskosität von 8,2 gewinnen. Wir glauben, in der beschriebenen Methode einen Weg gefunden zu haben, Hyaluronsäure in ähnlich hochpolymerem Zustand wie *Hadidian* und *Pirie* darzustellen, allerdings auf wesentlich einfachere und schnellere Weise.

³ *M. Pantlitschko*, Mh. Chem. **83**, 1125 (1952).

Erratum.

In der Arbeit „Zur Kenntnis des Hydroxylapatits“ von *E. Hayek*, *F. Müllner* und *F. Koller*, Mh. Chem. **82**, 959 (1951), ist auf S. 965, Zeile 8 und Zeile 12 von unten für das theoretische Verhältnis $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ 1,317 statt 1,33,

S. 966, Zeile 1 von oben 0,935 mg Ca^{++} statt 1,00 mg,

S. 966, Zeile 3 von oben $L_{13} = 1,9 \cdot 10^{-45}$ statt $2,6 \cdot 10^{-45}$,

S. 966, Zeile 5 von oben 2,17 mg Ca^{++} statt 2,37 mg und

S. 966, Zeile 6 von oben $L_{40} = 1,5 \cdot 10^{-41}$ statt $2,3 \cdot 10^{-41}$ zu setzen.