ETH zürich

ETH Library

# Studien über die quantitative Zusammensetzung des Knorpels

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**
Winter, Walter

**Publication date:**
1932

**Permanent link:**
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000090920

**Rights / license:**
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH : 678 B

# Studien über die quantitative Zusammensetzung des Knorpels.

Von der

**Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich**

zur Erlangung der

**Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften**

genehmigte

**Promotionsarbeit Nr. 678**

vorgelegt von

**Walter Winter**
aus **Richterswil.**

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH
Kat.
Ser

Referent: Herr **Prof. Dr. E. Winterstein.**
Korreferent: Herr **Prof. Dr. L. Ruzicka.**

Wien 1932.
Buchdruckerei Bruno Bartelt (A. C. Trupp), Wien XVIII., Theresiengasse 3.

Herrn Prof. v. Fürth bin ich für die Anregung zu vorliegenden Untersuchungen, für die unermüdliche Förderung ihres Fortganges und die mir gewährte Gastfreundschaft in seinem Institute zu herzlichstem Danke verpflichtet, ebenso Herrn Prof. Winterstein für seine wertvolle Interessenahme.

# Inhalt.

I. Einleitung . . . . . 5
A. Historisches . . . . . 5
Vorgeschichte . . . . . 5
Mörner . . . . . 7
Schmiedeberg . . . . . 8
Weitere Untersuchungen . . . . . 10
Levene . . . . . 13
Letzte Arbeiten . . . . . 16
B. Kritik der Theorie von Sawjalow . . . . . 19
C. Zweck vorliegender Untersuchungen . . . . . 21
II. Beschreibung der Versuche . . . . . 23
1. Behandlung des Materials . . . . . 23
2. Bestimmung des Schwefels . . . . . 23
3. Stickstoffbestimmungen . . . . . 24
4. Bestimmung flüchtiger Säure . . . . . 30
5. Reduktionsmessung . . . . . 32
6 Versuch zur Glukuronsäurebestimmung . . . . 33
7. Freies Glukosamin . . . . . 34
8. Aschebestimmung . . . . . 34
III. Besprechung der Resultate . . . . . 35
A. Glutin . . . . . 35
B. Chondroitinschwefelsäure . . . . . 36
C. Die Zusammensetzung des Knorpels . . . . . 42
Zusammenfassung . . . . . 42

Leer - Vide - Empty

# I. Einleitung.

## A. Historisches.

### Vorgeschichte.

Die Chemie des Knorpels reicht bis in die früheste Periode der organischen Chemie zurück, und das hat seinen Grund darin, daß aus Knorpel ein Körper gewonnen werden kann, der schon vor 100 Jahren wohlbekannt war — sogar technisch hergestellt wurde — nämlich der Leim. Berzelius bemerkt in seinem großen Lehrbuch, daß „Mundleim" selten auf einem Schreibtische entbehrt werden könne.

Da nun die Eigenschaften des Knochenleims schon recht gut bekannt waren — es ist erstaunlich, mit welch weitläufiger Ausführlichkeit jene Chemiker ihre scharfen Beobachtungen beschrieben — hatte man gleich verschiedene Anhaltspunkte, um den Knochenleim mit jenem zu vergleichen. Es war ein Anatome (I. Müller[1]), welcher da zum ersten Male verschiedene Unterschiede präzisierte und dem Knorpelleim den Namen Chondrin gab. Er konstatierte, daß eine wesentliche Verschiedenheit darin gelegen sei, daß Chondrin etwas Schwefel enthalte, während im Knochenleim nicht die Spur davon zu finden sei. Das Chondrin wurde als einheitliche Substanz betrachtet und viele Autoren bemühten sich, eine Formel dafür aufzustellen, so der von Berzelius zitierte Mulder,[2]) Scherer,[3]) Schröder,[4]) u. a. m.

Erst Schultze teilte 1849[5]) eine Beobachtung mit, die geeignet gewesen wäre, die Forschung in andere Bahnen zu lenken. Es war ihm aufgefallen, daß Knorpel nach Behandlung mit verdünnter Kalilauge bei 40° durch Kochen mit Wasser keine Chondrin- sondern eine Leimlösung gab. Da ihm eine solche „Verwandlung von Chondrin in Glutin" zur Erklärung des Verknöcherungsprozesses wichtig schien, stellte er in dieser Richtung weitere Versuche an, die ihn dann schließlich zur Widerrufung obiger Beobachtung führten.[6])

---

[1]) Ann. d. Chemie, XXI/277, 1837.
[2]) Ann., XXVIII/328, 1838.
[3]) Ann., XL/49, 1841.
[4]) Ann., XLV/52, 1843.
[5]) Ann. d. Chemie, LXXI/275, 1849.
[6]) J. prakt. Chem., LXXXIII/162, 1861.

Eine unter den Organikern vor einem Jahrhundert verbreitete Ansicht war, daß sich Eiweiß durch gewisse Manipulationen in Zucker umwandeln lasse. Das rührte wohl vornehmlich davon her, daß man mit der „Diagnose Zucker" leicht bei der Hand war, wo etwas süß schmeckte. Der Chemiestudent von 1840 mußte zum Beispiel lernen: Wenn man Leim mit kaustischem Kali so lange kocht, bis kein Ammoniak mehr entweicht, so verwandelt er sich in 4 Teile Zucker und 1 Teil Leucin.[7])

Als dann 1841 Trommer die Kupferreaktion auf Kohlehydrate auffand, wurde diese Körperklasse schärfer umrissen, und man erkannte, daß der Leimzucker eigentlich kein Zucker ist. Daher war es für die Anhänger jener Theorie wichtig [siehe zum Beispiel Schiff[8])], daß Boedeker 1854[9]) durch Kochen von hyalinem Knorpel mit Mineralsäuren „Zucker" erhielt, der nicht nur süß schmeckte, sondern auch Metalloxyde reduzierte. Da dieser „Zucker" aber saure Eigenschaften hatte, Stickstoff enthielt und nicht gärte, nannte er ihn Chondroitsäure. Später behaupte er allerdings, daß aus Knorpel sehr wohl richtiger Traubenzucker zu gewinnen sei und zog obigen Namen zurück.

Auch Gerhard[10]) will 1845 durch Behandeln von animalischer Gelatine mit Schwefelsäure einen vergärbaren Zucker erhalten haben.

Morochowetz[11]) sprach zum ersten Male klar aus, daß Chondrin ein Gemisch zweier Körper darstelle, wodurch er sich im Gegensatz zu der damals von Friedleben[12]) und Trommer[13]) vertretenen Ansicht stellte, daß Kollagen durch chemische Umwandlung aus Chondrogen entstehe. In dieser bedeutsamen Arbeit macht Morochowetz wahrscheinlich, daß Chondrin sich aus Glutin und Mucin zusammensetze. Das Vorkommen von Glutin im Knorpel ist seither anerkannt geblieben; Otto[14]) dürfte somit unter den letzten Gegnern dieser Ansicht gewesen sein, und zwar deshalb, weil er im Chondrin wohl Leucin aber kein Glykokoll nachweisen konnte.

Petri[15]) versuchte, die Substanzen des Reaktionsgemisches nach Einwirkung von Schwefelsäure und Wasserdampf auf Chondrin zu individualisieren, ohne indessen die Erkenntnis wesentlich fördern zu können.

---

[7]) Berzelius, Lehrbuch der Chemie, III. Aufl., IX/884.
[8]) Ann., CXIX/256, 1861.
[9]) Ann., CXVII/111, 1861.
[10]) Précis de Chimie organique. II/244, 1845.
[11]) Verhandl. d. naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg, I, H. 5, 1877.
[12]) Z. wissenschaftl. Zoolog., 10/20, 1860.
[13]) Archiv pathol. Anat., 19/554, 1860.
[14]) Ann., CIL/119, 1860.
[15]) Ber., XII/267, 1879.

Letzteres gelang hingegen Krukenberg,[16]), der, auf die Beobachtungen von Schultze zurückgehend, zerkleinerten Knorpel mit Natronlauge extrahierte und das Extrakt untersuchte. Er nahm Boedekers Bezeichnung Chondroitsäure wieder auf, welch letztere er durch Alkoholfällung des Extraktes und Dialyse eiweiß- und salzfrei zu erhalten versuchte. Er analysierte außer diesen Präparaten auch Eisensalze der Säure. Wenn auch seine Resultate, insbesondere seine Auswertung derselben hinsichtlich seiner Hyalinhypothese („Hyaline sind intermediäre, unbeständige Körper, die zwischen Eiweißstoffen und Kohlehydraten stehen"), heute als antiquiert bezeichnet werden müssen, so haben sie doch wesentlich dazu beigetragen, späteren Forschungen den Weg zu ebnen.

Wehner und Tollens[17]) machten das Vorhandensein eines echten Kohlehydrates im Knorpel dadurch wahrscheinlich, daß es ihnen gelang, im Rückstand des Schütteläthers eines salzsauren Knorpelhydrolysates Lävulinsäure als Silbersalz zu isolieren, freilich nur in äußerst geringer Menge (aus 500 g Knorpel 0.3 g Silbersalz).

Um 1890 erschienen zwei fundamentale Arbeiten, die noch heute neben den Untersuchungen von Levene die wichtigsten Grundlagen unseres Wissens in der Knorpelchemie bilden. Es sind dies die Publikationen von Mörner und Schmiedeberg. Während letzterer die spezifische Knorpelsubstanz — die Chondroitinschwefelsäure — bearbeitete, suchte ersterer die Zusammensetzung der Knorpelsubstanz überhaupt aufzuklären, ohne sich mit den einzelnen Bestandteilen allzu eingehend zu befassen.

### Mörners Untersuchungen.

Mörner[18]) fand, von histochemischen Untersuchungen ausgehend, vier Bestandteile des Knorpels auf:

1. Chondromucoid, aus Knorpel mit ätherhaltigem Wasser bei 40°. Er charakterisiert die Substanz als weiß, sauer, kochbeständig, durch viele Säuren aus Lösungen fällbar, nach Hydrolyse reduzierend wirkend, 12.6% Stickstoff und 2.4% Schwefel enthaltend. Durch stufenweise Spaltung mit Alkali stellte er drei Spaltprodukte davon fest: a) Albuminat, b) Chondroitsäure, c) peptonähnliche Substanz.

2. Chondroidsäure. Die durch Alkaliextraktion des Knorpels gewonnene Substanz (Entfernung von Eiweißstoffen und Salzen durch Fällungen bzw. durch Dialyse) charakterisierte

---

16) Z. Biol., 20/307, 1884.
17) Ann., CCXXXXIII/327, 1888.
18) Skand. Arch. Physiol., 1/120, 1889.

er als Säure vom Charakter einer Aether-Schwefelsäure, linksdrehend, salzbildend, nach Hydrolyse eine reduzierende Substanz liefernd.

Es findet sich also hier ein sehr ansehnliches Stück nach heutiger Anschauung richtiger Erkenntnis, was die Chondroitin-Schwefelsäure anbetrifft. Interessant scheint mir auch die Feststellung Mörners dahingehend, daß die Lösung eines mechanischen Gemenges von Glutin und Chondroitsäure sehr wohl die Lösung von Chondromucoid „simuliere".

Als weiteren Bestandteil des Knorpels fand Mörner:

3. Collagen. Er kam allerdings zum Schluß, daß das durch Digerieren des Knorpels mit Wasser und 0.01% Kalilauge und Behandeln des Rückstandes mit 0.3%iger Salzsäure gewonnene Glutin nicht völlig identisch sei mit Knochenleim, da der Stickstoffgehalt des ersteren nur 16.14% betrug, während Glutin um zirka 1% mehr Stickstoff enthält. Das läßt sich aber doch wohl durch Verunreinigung des Analysenmateriales mit Chondroitinschwefelsäure oder deren Spaltprodukte erklären, da durch so verdünnte Kalilauge die Chondroitinschwefelsäure kaum quantitativ entfernt wurde. Die Frage, ob das Collagen ein Umwandlungsprodukt (Schultze, Friedleben, Trommer), ein Spaltprodukt von Chondrin (Meißner, Landtwehr) sei, oder ob es präexistiere, wie Morochowetz und Kruckenberg postulieren, läßt er offen.

Als vierten Bestandteil hat Mörner (nur in den Knorpeln ausgewachsener Tiere) gefunden:

4. Ein Albumoid, das mit Alkalien Sulfidschwefel abgab und 15 bis 16% Stickstoff enthielt.

## Schmiedebergs Untersuchungen.

Von überragendem Interesse sind nun die in den Jahren 1883 bis 1891 in Straßburg ausgeführten Arbeiten von O. Schmiedeberg.[19]) Vorerst löste er das Problem, eiweißfreie Präparate der intakten Chondroitinschwefelsäure zu erhalten, in origineller Weise dadurch, daß er Knorpel der Magenverdauung unterwarf; das entstehende „Peptochondrin" ist leicht in Alkalien löslich (in der Kälte) und daraus kann durch Alkohol Kaliumchondroitinsulfat gefällt werden (eventuell als Doppelsalz mit Kupfer). Durch wiederholtes Umfällen gelangte Schmiedeberg zu eiweißfreien (keine Biuretreaktion mehr gebenden) Analysensubstanzen. Er gab der Säure und ihren Spaltprodukten ihre heutigen zweckmäßigen Benennungen. Zur Aufstellung einer Konstitutionsformel für die Säure gelangte Schmiedeberg auf folgende Weise:

---

[19]) Arch. exp. Path., 28/355, 1891.

Die Elementaranalyse verschiedener Salze ergab die Formel

$$C_{18}H_{27}O_{17}NS.$$

Durch Säurespaltung des Bariumsalzes gewann Schmiedeberg daraus das Chondroitin, welches das Vermögen, Kupferoxyd zu reduzieren, noch nicht besitzen soll und für welches er auf Grund von Elementaranalysen die Formel

$$C_{18}H_{27}O_{14}N$$

errechnet. Daraus stellte Schmiedeberg durch Hydrolyse mit verdünnter Salpetersäure Chondrosin her, das als gummiartig, reduzierend (pro Mol 5.45 Mol. Cu), optisch aktiv ($[\alpha]_D = +42.0^0$) beschrieben wird und dessen Elementaranalyse die Formel

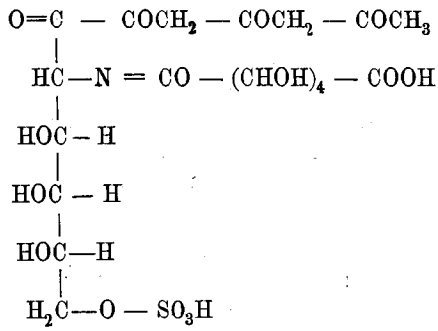
$$C_{12}H_{21}O_{11}N$$

ergab. Bei dieser Spaltung nahm Schmiedeberg als Nebenprodukt Essigsäure wahr (identifiziert durch das Silbersalz). Da die Differenz der Bruttoformeln es verlangt, finden sich in seiner Konstitutionsformel (siehe unten) drei Azetylgruppen.

Die schwierige Aufgabe, die Konstitution des Chondrosins festzustellen, konnte Schmiedeberg nur auf verschiedenen Umwegen lösen. Glukuronsäure als eine Komponente wurde wie folgt wahrscheinlich gemacht: Wenn man Chondrosin andauernd mit überschüssigem Baryt kocht, so bilden sich drei Säuren, deren Bariumsalze getrennt und analysiert wurden. Zwei derselben wurden auch unter den Zersetzungsprodukten der Glukuronsäure gefunden. Nach der Bruttoformel des Chondrosins bleibt nun noch die des Glukosamins übrig. Das Vorhandensein des letzteren wurde auch dadurch wahrscheinlich gemacht, daß durch Erhitzen von Glukosamin mit Barythydrat das Bariumsalz einer Säure aufgefunden werden konnte, das einem obiger drei Bariumsalze aus Chondrosin, welches nicht zu den Zersetzungsprodukten der Glukuronsäure gehört, sehr annähernd glich.

Nach Schmiedeberg kommt eine saure Spaltung des Chondrosins in seine zwei Komponenten überhaupt nicht zustande, während Alkalien das Glukosamin sofort weiter zersetzen unter Ammoniakentwicklung. Deswegen glaubt Schmiedeberg, daß die zwei Körper im Chondrosin-Molekül vermittelst des Stickstoffs aneinandergekettet sind.

Gegen die Annahme, daß Chondroitin das am Stickstoff azetylierte Derivat des Chondrosins sei, spricht nach Schmiedeberg noch folgendes: Die reduzierende Kraft des Moleküls trete erst nach Abspaltung der Essigsäure auf; also müsse die Aldehydgruppe im Chondroitin durch die Azetyle gedeckt sein. So stellt denn Schmiedeberg folgende Konstitutionsformel für die Chondroitin-Schwefelsäure auf:



Ueber die Bindung der Säure im Knorpel entwickelte Schmiedeberg die Vorstellung, daß sie darin in vielen verschiedenen salzartigen Verbindungen vorkomme, was er hauptsächlich auf seine Beobachtung stützte, daß Chondroitin-Schwefelsäure viele Eiweißstoffe aus ihren Lösungen zu fällen vermöge.

## Weitere Untersuchungen.

Auf die Erkenntnisse dieser beiden Arbeiten stützen sich nun die Untersuchungen von Oddi[20]) und Krawkow[21]) über die Amyloidenentartung der Leber. Die beiden Autoren stellen fest, daß die Chondroitin-Schwefelsäure stets bei dieser Entartung in Leber, Milz und Niere zu finden ist; in den gesunden Organen fehlt sie. Es gelingt aber weder diesen Autoren noch Kettner,[22]) durch Fütterungsversuche mit Chondroitin-Schwefelsäure die Amyloidentartung experimentell hervorzurufen.

Mörner[23]) studierte weiter die Verbreitung der Chondroitin-Schwefelsäure. Zum Nachweis der Säure wandte er folgende Methode an: Das gut zerkleinerte Material wird mit 2%iger Kalilauge digeriert, die Lösung nach Filtration angesäuert und mit Bariumkarbonat aufgekocht, das Filtrat davon wird mit Bariumkarbonat eingedampft. Den Auszug mit siedendem Wasser fällte er nach Filtration mit Alkohol. Dieser Niederschlag muß nun die Chondroitin-Schwefelsäure enthalten, falls solche vorhanden ist. Sie wird identifiziert durch ihr Verhalten zu essigsaurer Leimlösung und zu verdünnter kochender Salzsäure (Abspaltung von Schwefelsäure und Auftreten eines reduzierenden Körpers). Die umfassenden Untersuchungen führten Mörner zum Schluß, daß Chondroitin-Schwefelsäure nicht nur ein konstanter, sondern auch ein spezifischer Bestandteil der knorpeligen Gewebe sei.

---

[20]) Arch. exp. Pathol., 33/376, 1894.
[21]) Arch. exp. Pathol., 40/195, 1897.
[22]) Arch. exp. Pathol., 47/178, 1902.
[23]) Z. physiol. Chem., 20/357, 1894.

Während sich also das Hauptinteresse der Forschung auf den kohlehydrathaltigen Bestandteil des Knorpels richtete, untersuchte Sadikoff[24]) das Glutin, welches er aus tierischem Nasen-, Tracheal- und Ohrknorpel wie folgt gewann: Entfernung der Chondroitin-Schwefelsäure durch fünftägiges Stehenlassen mit 0.25%iger Kalilauge, Auswaschen und Erhitzen mit Wasser, wobei ein Rückstand zurückblieb, der sich nach Sadikoff aus Knorpelzellen und Albumoid zusammensetzte. Für Knorpelleim schlägt der Verfasser den Namen Glutein vor, da sich dieser von Gelatine durch folgende Reaktionen unterscheidet:

1. Gluteine reduzieren nach Säurespaltung in schwachem Grade Kupferoxydsalze.

2. Sie geben eine Reaktion mit Phloroglucinsalzsäure. Der Untersucher will durch Mitteilung seiner Beobachtung, daß die letzten Alkaliauszüge des Knorpels keine Substanz mehr enthielten, die nach Kochen mit Säure die Reduktionsprobe gab, glaubhaft machen, daß obige Reaktionen nicht auf zurückgebliebene Chondroitin-Schwefelsäure zurückzuführen seien.

Sadikoffs Analysen ergaben folgende durchschnittliche Zusammensetzung der Gluteine:

| | Nasenglutein | | | Tracheal- | Ohrglutein | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | glutein | I | II |
| C | 50.22 | 50.30 | 50.46 | — | — | — |
| H | 7.12 | 6.80 | 7 02 | — | — | — |
| N (Kjeldahl) | 16.12 | — | 17.00 | 17.46 | — | — |
| N (Dumas) | 17.81 | — | 17.72 | 17.87 | — | — |
| S (Liebig) | 0.535 | 0.623 | 0 607 | 0.714 | 0.712 | 0.619 |
| S (Asboth) | 0.525 | 0.638 | 0.610 | 0.685 | 0.698 | 0.654 |

Im ersten Dezennium unseres Jahrhunderts wurden verschiedene Zweifel an der Richtigkeit der Schmiedebergschen Konstitutionsformel der Chondroitin-Schwefelsäure laut. Staehelin (unter Führung Müllers) konnte im Knorpel kein Glukosamin nachweisen.[25])

Orgler und Neuberg[26]) bestreiten energisch die Formel von Schmiedeberg: Die Beständigkeit und Indifferenz der Säure stehe im Widerspruch zu der von Schmiedeberg angenommenen Konstitution, ebenso die Unangreifbarkeit durch Salpetersäure; ferner sei nach ihrer Erfahrung eine Bindung vom Typus

$$— CH — N = HC — CHOH —$$

sehr empfindlich gegen hydrolysierende Säure. Die Autoren fanden das Molekulargewicht der Säure zwei- bis dreimal

---

24) Z. physiol. Chem., 39/411, 1903.
25) Z. Biol., 42/534, 1901.
26) Z. physiol. Chem., 37/407, 1903.

höher als es der Schmiedebergschen Formel entspricht. Glukuronsäure als Komponente des Chondrosins wurde bestritten, da die Phloroglucin- und Orcinprobe (auch in der Modifikation nach Bial) stets negativ waren. Durch Destillation mit Salzsäure erhielten sie keine Spur Furfurol. Auch zwei weitere Methoden zur Auffindung der Glukuronsäure (p-Bromphenylhydrazinverbindung und Oxydationsverfahren, beide nach Neuberg[27]) führten zu negativen Resultaten. Die Verfasser wollen vielmehr glaubhaft machen, daß eine Oxyaminosäure $C_6H_{13}O_6N$ am Aufbau des Chondrosins beteiligt sei, neben einem noch zu identifizierenden Zucker.

Auch Fränkel[28]) kam zu ähnlichen Vermutungen wie Orgler und Neuberg. Zwar bekam er ohne weitere Schwierigkeiten Furfurol aus der Chondroitinschwefelsäure bei Verwendung von 20%iger Salzsäure. In zwei von vielen Versuchen ist es ihm hingegen gelungen, aus Chondrosin eine Säure darzustellen, deren Elementaranalyse zu einer Aminoglukuronsäure führte. Als zweite Komponente vermutete er eine labile Hexose.

Pons[29]) stellte chondroitinschwefelsaures Natrium nach dem Verfahren von Mörner her. Das Präparat zeigte die verlangten Reaktionen und die Zusammensetzung 3.7% N, 7.49% Na und 3.35% S. Er war der erste, der quantitative Furfurolbestimmungen ausführte, und zwar nach dem Verfahren von Tollens.[30]) Aus obigem Salz gewann er 6.56% bzw. 6.90% Furfurol, also annähernd soviel, wie die Formel von Levene (siehe unten) verlangt. Aus dem Salz konnte er 5.27% Schwefel als Schwefelsäure durch Salzsäure abspalten. Mit vieler Mühe stellte Pons aus chondroitinschwefelsaurem Blei eine Phenylhydrazinverbindung her, deren allerdings schwankende Elementaranalysenresultate das Vorliegen eines Hexose- oder Pentose-Osazons ausschließen. Auch die Herstellung einer Benzoylverbindung des Chondrosins ließ keine eindeutigen Schlüsse zu. Pons konstatierte im übrigen, daß sich die Säure mit zwei Teilen Histon verbindet, und daß sie als empfindliches Reagens auf Albumin im Harn verwendet werden könne.

Die Arbeit von K. Kondo[31]) ist insofern von Bedeutung, als sie neben wertvollen analytischen Daten des Verfassers selbst, der die Chondroitin-Schwefelsäure durch Alkaliextraktion und Fällung mit Essigsäure gewann, eine vergleichende Zusammenstellung mit den Resultaten von Mörner, Schmiedeberg

---

[27]) Ber., 32/2395 und Ber., 34/3840, 1899 bzw. 1901.
[28]) Ann. Chem., 351/344, 1907.
[29]) Arch. int. Physiol., 8/393, 1909.
[30]) Z. physiol. Chem., 24/239, 1902.
[31]) Biochem. Z., 26/116, 1910.

und Pons aufweist, aus der mit einiger Sicherheit der Schluß gezogen wurde, daß im Molekül das Verhältnis der Atome annähernd folgendes ist: 1 N, 1 S, 2 durch Metalle ersetzbare H, 15 bis 16 C und etwas mehr O.

Die Chondroitinschwefelsäure und ihre Abbauprodukte waren bisher immer nur in amorpher Form erhalten worden, woraus sich die Unsicherheit im ganzen Forschungsgebiet wohl großenteils erklärt.

Es war das Verdienst Hebtings,[32]) gezeigt zu haben, wie man ein dem Chondrosin offenbar sehr nahe stehendes Produkt, das Chondridin, kristallisiert erhält durch Oxalsäurespaltung der Chondroitinschwefelsäure und Alkoholfällung. Durch wiederholtes Umfällen erhielt Hebting schließlich farblose, aschefreie Nadeln, deren Elementaranalysen genau

$$C_{12}H_{23}NO_{12}$$

ergeben, während Schmiedeberg für sein Chondrosin

$$C_{12}H_{21}NO_{11}$$

angibt. Die spezifische Drehung der Substanz ist $+ 41^0$, ein Mol. vermag 7.6 Mol. CuO zu reduzieren (Chondrosin 5.45 Mol. CuO nach Schmiedeberg). Für den salzsauren Aethylester des Chondrins konnte Hebting die Formel

$$C_{12}H_{20}NO_{11}(C_2H_5)HCl$$

durch Elementaranalysen erhärten. 1 Mol. des Esters reduzierte 5.11 Mol. CuO.

Alzona[33]) fand für chondroitinschwefelsaures Natrium die Bruttoformel

$$Na_2C_{14}H_{23}O_{16}NS$$

und eine spezifische Drehung von $-29.6^0$.

Neuberg und Rubin[34]) konstatierten, daß sich durch Einwirkung von Fäulnisbakterien auf Chondroitinschwefelsäure Schwefelsäure und Thiosulfat bilde.

### Levenes Arbeiten.

Levene und LaForge berichten in fünf Abhandlungen[35]) über ihre grundlegenden und erfolgreichen Arbeiten zur Aufklärung der Konstitution der Chondroitinschwefelsäure. Die Ansichten, die hier motiviert werden, gelten heute im allgemeinen als die der Wahrheit am nächsten kommenden. Uns ist als

---

[32]) Biochem. Z., 63/352, 1914.

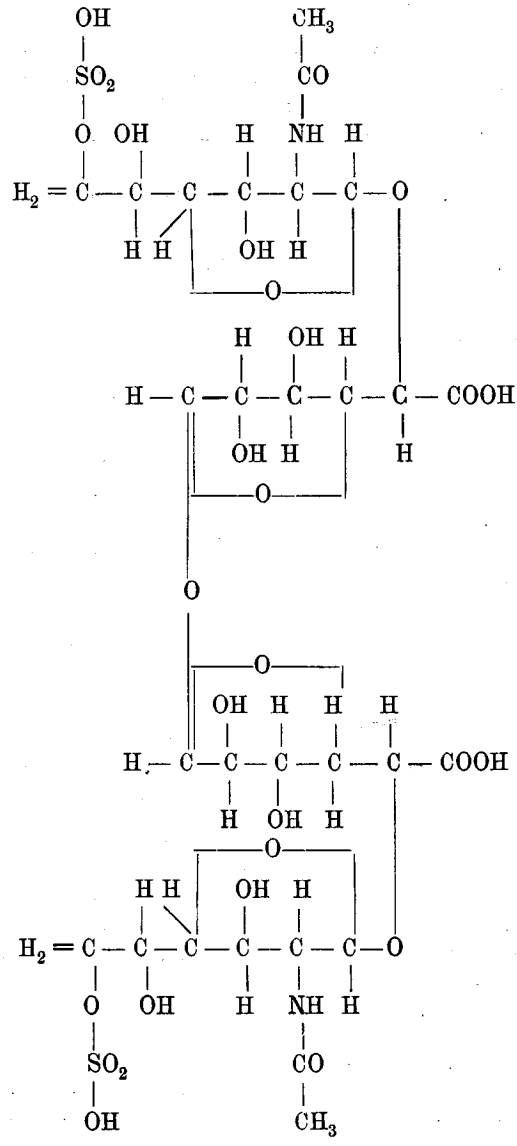
[33]) Biochem. Z., 66/408, 1914.

[34]) Bioch. Z., 67/82, 1914.

[35]) J. Biol. Chem., 15/69, 15/155, 1913; J. Biol. Chem., 18/123, 1914; J. Biol. Chem., 20/433, 1915; Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 1/190, 1915.

Ausnahme nur das Biochemische Institut in Sofia bekannt, dessen Forschungsresultate nicht nur bezüglich der Verbindung der einzelnen Komponenten im Molekül der Chondroitinschwefelsäure, sondern auch hinsichtlich der Natur der Komponenten selbst fundamental von Levene abweichen (siehe S. 00 ff.).

Obige Autoren fassen ihre Resultate in folgender Konstitutionsformel zusammen:



Die Chondroitinschwefelsäure, bzw. deren Bariumsalz wurde aus Knorpel gewonnen, durch Alkaliextraktion und Eisessigfällung, das Chondrosin daraus durch Hydrolyse mit Salzsäure.

Da es nicht möglich ist, Chondrosin durch die üblichen hydrolytischen Agentien zu spalten, ohne daß sich dabei mindestens eine der beiden Komponenten zersetzt, wandten Levene und La Forge zur Isolierung der Glukuronsäure Natriumamalgam als Spaltmittel an. Die Charakterisierung mit Hilfe der Phenyl- und p-Bromphenylhydrazinderivate und Oxydation mit Brom und mit Salpetersäure scheint unwiderlegbar zu beweisen, daß Glukuronsäure eine Komponente des Chondrosins bildet.

Die Bildung von Lävulinsäure durch Einwirkung von Mineralsäuren auf Desamidochondrosin sprach für das Vorhandensein einer Aminohexose, die dann auch durch Einwirkung von starker Salzsäure auf Bariumchondrointinsulfat isoliert und auf Grund von Elementaranalysen als solche identifiziert werden konnte. Das genaue Studium der physikalischen Eigenschaften dieser Aminohexose und ihrer Derivate und der Vergleich der Resultate mit den Ergebnissen der Untersuchung des Glukosamins und entsprechender Derivate desselben führten die Verfasser zum Schluß, daß dieses „Chondrosamin" mit Glukosamin nicht identisch sondern nur isomer sei. Sie glaubten ferner, daß dem Chondrosamin die Konfiguration von α-Altrosamin oder α-Allosamin zukomme.

Die Essigsäurebestimmungen der Autoren ergeben, daß pro Atom Stickstoff ein Mol. Essigsäure vorhanden ist und nicht drei, wie Schmiedeberg es postulierte.

Die Formel von Levene und La Forge weicht nun hinsichtlich der Bindung der vier Komponenten im Molekül der Chondroitinschwefelsäure stark von Schmiedebergs Ansicht ab, was wie folgt begründet wird: Glukuronsäure und Chondrosamin sind nicht durch eine Stickstoffbrücke verbunden, da Chondrosin eine freie Aminogruppe enthält, die mit salpetriger Säure abspaltbar ist. Da letztere Reaktion beim Chondroitin negativ ist, ist hier diese Gruppe azetyliert. Daß die Carbonylgruppe der Glukuronsäure nicht die Verbindung mit dem Chondrosamin vermittelt, scheint bewiesen durch die Tatsache, daß nach Oxydation von Chondrosin mit Salpetersäure nur eine minimale Menge (viel weniger als ohne Oxydation) Furfurol zu gewinnen ist. Da Chondrosin aber nur eine freie reduzierende Gruppe enthält, ist eine glukosidische Bindung mit der Karbonylgruppe des Chondrosamins anzunehmen, wofür bei der Glukuronsäure nur die α-Stellung in Frage kommt, „da Chondrosin offenbar eine freie Carboxylgruppe besitzt".

Endlich bietet die Annahme einer glukosidischen Verbindung zweier Chondrosinmoleküle die einfachste Erklärung dafür, daß

Chondroitin Kupferoxyd nicht zu reduzieren vermag, wohl aber Chondrosin.

Levene hat in späteren Arbeiten die neue Aminohexose Chondrosamin zu verschiedenen Studien über Isomerieverhältnisse von Kohlehydraten benützt,[36]) die aber hier, wo in erster Linie die molekulare Zusammensetzung der Chondroitinschwefelsäure in Frage steht, weniger interessieren.

## Letzte Arbeiten.

1920 setzte sich Schmiedeberg in einer rein theoretischen Abhandlung mit den Untersuchungsergebnissen von Levene auseinander.[37]) Die einzige darin angeführte neue Analyse bestätigt, daß pro Atom Stickstoff ein Mol. Essigsäure am Aufbau des Chondroitinschwefelsäuremoleküls teilnimmt, womit er also seine frühere Behauptung zurücknimmt.

Da nun bei Durchrechnung seiner früheren Elementaranalysen einige Kohlenstoffatome übrig bleiben, nimmt Schmiedeberg an, daß sie zu einer weiteren Hexose des Chondroitinschwefelsäuremoleküls gehören, „über deren Natur sich natürlich nichts Näheres angeben läßt", so daß die Säure

$$C_{34}H_{54}N_2S_2O_{34}$$

zusammengesetzt wäre aus

2 Mol. Glukosamin,
2 Mol. Glukuronsäure,
1 Mol. Hexose,
2 Mol. Essigsäure,
2 Mol. Schwefelsäure,
minus 9 $H_2O$.

Die Annahme jener Hexose ist durch nichts weiter belegt.

Ferner hält Schmiedeberg die Annahme glukosidischer Bindungen nicht für zutreffend, da Chondrosin keine freie Aminogruppe enthalte; bei dem entsprechenden Versuche von Levene sei offenbar Chondrosin schon aufgespalten worden.

Des weiteren stehe die Annahme glukosidischer Bindungen im Widerspruch zu der schweren Hydrolysierbarkeit des Chondrosins.

Auch bestreitet Schmiedeberg die Levenesche Ansicht, daß die Aminohexose der Chondroitinschwefelsäure nur isomer, nicht aber identisch sei mit Glukosamin.

Schließlich wertete er die bisherigen Forschungsergebnisse in einer Hypothese aus, nach welcher sich die Chondroitinschwefelsäure im Organismus als Nebenprodukt bei der Umwandlung des Eiweißes in Collagen bilde.

---

[36]) J. biol. Chem., 21/351, 25/511, 26/367, 26/143, 1915—17.
[37]) Z. für exp. Pathologie, 87/45, 1920.

Rakusin (Petersburg) fand 1922 folgende Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Chondroitinschwefelsäure:[38]) Aluminiumhydroxyd wird mit der zu bestimmenden Chondrinlösung (Konzentration $\leq$ 0.2) übergossen. Vom Aluminiumhydroxyd werden nun alle eiweißartigen Substanzen adsorbiert, während das Filtrat eine wässerige Lösung von Chondroitinschwefelsäure darstelle, welch letzteres Rakusin damit zu beweisen glaubt, daß darin die Bariumchloridreaktion nach Säurespaltung positiv, die Lösung linksdrehend sei und sich beim Eindampfen eine mikrokristalline Substanz gewinnen lasse, die 6.27% Schwefel enthält. Rakusin findet in der Chondrinlösung 48.26% „Chondrinrückstand" (offenbar Glutin) und 51.74% Chondroitinschwefelsäure, welche Zahlen offenbar aus der Differenz der Konzentration vor und nach der Adsorption errechnet sind.

In der Gelatine fand Rakusin nach seiner Methode 25.5% Chondroitinschwefelsäure. Er kontrollierte diese Zahl durch Bestimmung des Gesamtschwefels der Gelatine. Da die Vohlsche Probe negativ ausfiel, berechnete er allen Schwefel als Chondroitinschwefelsäure und erhielt dieselbe Zahl.

A. Mathews[39]) berichtet über eine quantitative Bestimmung von Chondroitinschwefelsäure im Knorpel (Entosternit) des Limulus durch Messung ihrer Zerfallsprodukte. Er erreichte dabei folgende Uebereinstimmung:

1. Aus Schwefelsäure 2.82% Chondroitinschwefelsäure,
2. aus Essigsäure (bzw. flüchtigen Säuren) 2.5%,
3. aus Furfurol 1.2%.

Die flüchtigen Säuren wurden so bestimmt, daß durch das heiße saure Hydrolysat (20% Schwefelsäure) während 30 Min. ein Luftstrom gesaugt wurde, der dann in titrierter Natronlauge gewaschen wurde.

Ob die Identität mit Essigsäure festgestellt wurde und ob auf diese Weise wirklich alle flüchtige Säure gemessen wurde, geht aus der Veröffentlichung nicht hervor.

Steudel und seine Mitarbeiter vertreten bekanntlich seit etwa zwei Jahrzehnten die Ansicht, daß die Einteilung der Eiweißkörper in Proteine und Proteide keine natürliche Berechtigung habe, sondern daß viele Eiweißkörper, je nach ihrer mehr sauren oder basischen Natur, die Fähigkeit haben, mit gewissen Säuren, den Vertretern der „prosthetischen Gruppen", salzartige Verbindungen einzugehen. Dann wären alle Proteine, analog der Spannungsreihe der Elemente, in eine Reihe einzu-

---

[38]) Biochem. Z., 130/278, 1922; Z. f. Untersuchung der Lebensmittel, 52/397, 1926.

[39]) Z. physiol. Chem., 130/169, 1923.

ordnen, an deren einem Ende die stärkst basischen und an deren anderem die stärkst sauren Proteine ständen. Der Begriff der Proteide käme in Wegfall; die diesbezüglichen Eiweißkörper finden sich am basischen Ende obiger Reihe.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend, nahm Takahata (im Laboratorium Steudels) seine Untersuchungen über Chondroproteide vor.[40]) Er stellte künstlich einige Salze von Chondroitinschwefelsäure mit Eiweißkörpern her. So entsteht zum Beispiel beim Versetzen einer Lösung von 5 g Clupeinsulfat mit 5.6 g Kaliumchondroitinsulfatlösung 8 g weißer Niederschlag. Aus Stickstoff- und Schwefelbestimmungen ergibt sich, daß das Salz aus 47.5% Chondroitinschwefelsäure und 52.5% Clupein besteht. Auch das aus Nasenknorpelcollagen und Chondroitinschwefelsäure gewonnene Chondrocollagen zeigt die verlangten Eigenschaften und besteht nach den Schwefel- und Stickstoffbestimmungen aus 82.5% Collagen und 17.5% Chondroitinschwefelsäure. Es sei hier aber ausdrücklich festgestellt, daß diese Zahlen keineswegs der Zusammensetzung der natürlich vorkommenden Chondroproteide entsprechen sollen.

Harpuder[41]) nahm umfassende physikalisch-chemische Untersuchungen sowohl am intakten Knorpel als auch an einigen Bestandteilen desselben vor, was wichtig schien, um in Ergänzung der chemischen Bearbeitung weitere Aufschlüsse über die Physiologie und Pathologie des Knorpelgewebes zu ermöglichen. Die Versuche am intakten Knorpel (Permeabilität, Quellung, Ionenabgabe) interessieren hier weniger, wohl aber die Versuche an Bestandteilen, die eine Bestätigung der Mörnerschen Ansichten bringen. Es werden für das Chondromukoid, das Albumoid, die Chondroitinschwefelsäure und das Glutin die Fällungsbedingungen festgestellt; ferner fand Harpuder, daß Knorpelglutin sich von gewöhnlichem nicht unterscheide. Die Messung der Dissoziationskonstanten der Chondroitinschwefelsäure ergab, daß sie bezüglich ihrer Stärke zwischen Harn- und Kohlensäure zu stehen kommt.

E. Jorpes (im Laboratorium von Euler) konstatierte, daß es keine Methode zur Darstellung der Chondroitinschwefelsäure gebe, welche intakte Präparate liefert.[42]) Selbst die Extraktion mit ganz verdünntem Alkali hat mindestens eine teilweise Schwefelabspaltung zur Folge. Der Verfasser bemühte sich, diesen Mangel zu beheben durch Extraktion mit Kochsalzlösung und Alkoholfällung, ohne indessen einen durchgreifenden Erfolg zu erzielen.

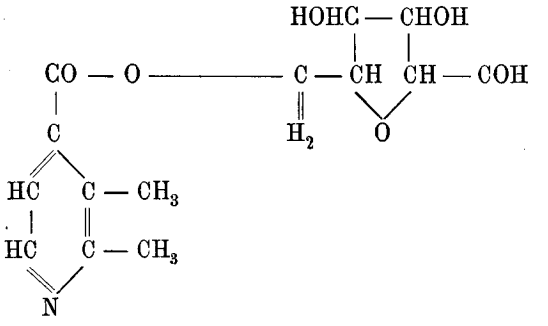
---

[40]) Z. physiol. Chem., 136, 82, 1924.
[41]) Biochem. Z., 169, 308, 1926.
[42]) Biochem. Z., 204/354, 1928.

## B. Kritik der Theorie von Sawjalow.

W. Sawjalow ist der einzige uns bekannte Autor, der sich in fundamentalen Gegensatz zu Levene stellt.[43]) Im folgenden seien seine Ansichten kritisch dargelegt.

Der Autor kommt zum Schluß, Chondrosin sei der Ester aus Lutidinkarbonsäure und Chitose! Er stellt dafür folgende Formel auf:




Die Teilnahme der Chitose am Aufbau des Chondrosins wird wie folgt begründet:

Sawjalow konstatierte, 1. daß beim Kochen von Chondrosin (die Abweichung der Bruttoformel von der Levenes wird mit Hygroskopie erklärt) mit Barytwasser Chitonsäure gebildet wird, welche als Cinchoninsalz analysiert wurde, 2. daß aus Chondrosin durch Erwärmen mit Salpetersäure Isozuckersäure erhalten wird, 3. daß nach mehrstündiger Hydrolyse von Chondroitinschwefelsäure (nach Oddi hergestellt) sich Chitose-Tribenzoat gewinnen läßt (leider ist nicht ersichtlich, in welcher Ausbeute).

Auf Grund dieser Feststellungen und der Tatsache, daß seine Bemühungen zum Nachweis von Glukosamin fehlgeschlagen sind, behauptet der Verfasser, daß nicht Glukosamin sondern Chitose den einen Teil des Chondrosins bilde.

Selbst abgesehen von der Tatsache, daß Levene 15 Jahre vorher das Vorkommen einer Aminohexose im Molekül der Chondroitinschwefelsäure eindeutig bewiesen hat, scheint uns die Beweisführung Sawjalows nicht überzeugend. Wir halten vielmehr dafür, daß die Chitose sich stets sekundär aus der Aminohexose gebildet habe, denn Chitose entsteht bekanntlich

---

[43]) a) Z. physiol. Chem., 126/219, 1923. Ferner hatte Herr Dr. V. V. Sawjalow die Freundlichkeit, uns zwei Sonderabdrücke der etwas schwierig zugänglichen Veröffentlichungen seines 1930 verstorbenen Vaters gütigst zu übersenden: b) Sawjalow und Janischewsky: Jb. d. Univ. Sofia, 1927. c) W. Sawjalow und Milowanoff: Arch. Farm. sper., 1929, **47**.

unter mannigfachen Bedingungen aus Glukosamin. Ueber Chitose als Zwischenprodukt haben sich wahrscheinlich auch die Chiton- und Isozuckersäure aus der Aminohexose gebildet. Wir sehen also hier keine Veranlassung, von der Ansicht Levenes abzuweichen.

Was nun die zweite, viel weiter tragende Behauptung Sawjalows anbelangt, nämlich das Vorkommen von Lutidinkarbonsäure als Bestandteil des Chondrosins, so finden sich in den zitierten Publikationen so gut wie keine Beweise dafür.

Der Autor sagt wiederholt, daß beim Behandeln von Chondrosin mit überschüssigem Barytwasser eine Base $C_7H_9N$ in Lösung bleibe (leider sind auch hier nirgends Ausbeuten angegeben). Nun wird auf unveröffentlichte Untersuchungen hingewiesen, die ergeben haben sollen, daß bei trockener Destillation von Chondroitinschwefelsäure oder von Trockenknorpel mit Kalk ein Destillat erhalten wurde, aus welchem Lutidin durch fraktionierte Destillation gewonnen wurde, das sich mit Sublimat und Platinchlorwasserstoffsäure zu kristallisierten Verbindungen umsetze.

Irgendwelche analytische Belegzahlen oder Ausbeuteangaben fehlen, ja es ist nicht einmal zu ersehen, ob die Identität jener Base $C_7H_9N$, die bei etwas milderer Behandlung gewonnen wurde, mit dem Lutidin der trockenen Destillation festgestellt wurde. Es ist nämlich zu berücksichtigen, daß im trockenen Destillat von reiner Gelatine Pyridinhomologe gefunden wurden,[44]) so daß das Auftreten geringer Mengen von Pyridinderivaten bei trockener Destillation von Knorpel nicht durch eine so gewagte Theorie erklärt werden müßte.

Wenn auch Sawjalow zugibt, daß die Struktur der Lutidinkarbonsäure noch nicht bestimmt sei, so halten wir dafür, daß die angegebenen Tatsachen nicht geeignet seien, die Existenz eines Pyridinringes im Molekül der Chondroitinschwefelsäure auch nur wahrscheinlich zu machen.

Wir haben trotzdem folgenden Versuch angestellt, der zeigen soll, daß bei Behandlung des Knorpels mit Barytwasser im Destillat keine wesentlichen Mengen einer anderen Base als Ammoniak auftreten:

5 g Knorpeltrockensubstanz (siehe S. 23) wurden mit überschüssigem, stark übersättigtem Barytwasser in vorgelegte titrierte Salzsäure destilliert, bis das Uebergehende neutral war. Bei nachfolgender Destillation mit auf 150 bis 170° überhitztem Wasserdampf gingen keine Basen mehr über, was durch Zurücktitrieren der vorgelegten Salzsäure konstatiert wurde. Bei dieser Behandlungsweise müßte eventuelles Lutidin in das Destillat über-

---

[44]) Ber., 13, A/85, 1880.

gehen.[45]) Das Destillat wurde nach der Titration mit Natronlauge alkalisch gemacht und das freigewordene Ammoniak mittels eines zirka zwölf Tage lang durchgeleiteten Luftstromes ausgetrieben. Die Luft passierte erst eine Reinigungsflasche, darauf das alkalische Destillat, dann eine Waschflasche mit vorgelegter Säure von bekanntem Titer und zum Schluß eine Kontrollflasche.

Die Vorlage wurde nach ein bis drei Tagen jeweils gewechselt und die Menge ausgelüfteten Ammoniaks durch Zurücktitrieren der Säure bestimmt. Nach zirka zwölf Tagen ging nichts mehr über. Es ergab sich nun, daß auf diese Weise fast alle Base, die im Destillat gefunden worden war, sich entfernen ließ, so daß höchstens unbedeutende Mengen einer anderen Base als Ammoniak vorliegen können. Wenn auch alles Restliche Lutidin wäre, so wäre die so zu errechnende Menge nicht annähernd von derselben Größenordnung, wie die nach der Sawjalowschen Theorie aus 5 g Knorpel zu erwartende.

Analytischer Beleg:

Bei der Destillation vorgelegt:

| | |
|---|---|
| 100 cm³ 2 n-Säure. 1 cm³ davon verbrauchte 20.05 cm³ n/10-Lauge (Mittelwert), 100 cm³ also . . . . . | 2005 cm³ n/10-Lauge |
| Das Destillat wurde auf 500 cm³ verdünnt. 2 cm³ davon verbrauchten 7.56 cm³ n/10-Lauge (Mittelwert), 500 cm³ also . . . . . | 1890 cm³ n/10-Lauge |
| Gefunden wurden also . . . . . | 115 cm³ n/10-Base. |

Die Auslüftung ergab:

In der Waschflasche wurden vorgelegt:

| | |
|---|---|
| 6.20 cm³ 2 n HCl, welche verbrauchen . . | 2406 cm³ n/10-Lauge |
| Tatsächlich total verbraucht . . . . . | 2300 cm³ n/10-Lauge |
| Wiedergefunden also . . . . . | 106 cm³ n/10-Base. |

Wir halten also auf Grund vorstehender Betrachtungen die Theorie von Sawjalow über die Konstitution des Chondrosins nicht für genügend gestützt.

## C. Zweck vorliegender Untersuchungen.

Es ist bis heute kaum untersucht worden, wieviel Chondroitin-Schwefelsäure im Knorpel vorhanden ist. Die Methode von Rakusin[46]) scheint doch in mancher Hinsicht wenig fundiert und hat wohl nur sehr beschränkte Anwendungsmöglichkeiten. Daß keine quantitativen Untersuchungen über die Chondroitinschwefelsäure des Knorpels vorliegen, hat seinen Grund wohl

[45]) C. f. Ahrens und Gorkow: B., 37/2062, 1904.
[46]) l. c.

darin, daß ein klarer Einblick auf einfache Art und Weise nicht zu gewinnen ist. So erlaubt zum Beispiel die gelegentlich ausgeführte Messung der durch saure Hydrolyse abgespaltenen Schwefelsäure allein nur dann einen sicheren Rückschluß auf die Chondroitinschwefelsäure, wenn mit Sicherheit feststeht, daß die Schwefelsäure nicht auch aus anderer Quelle stammen könnte.

Da eine Klärung der quantitativen Zusammensetzung des Knorpels an sich und wohl auch für die Beurteilung der Physiologie dieses Gewebes wünschenswert schien, wurde das Studium dieser Frage zum Gegenstand vorliegender Arbeit gemacht.

Wir gingen von folgender Arbeitshypothese aus: Der Knorpel besteht chemisch aus drei Bestandteilen; nämlich Glutin, Chondroitinschwefelsäure und Asche. Wir kümmerten uns also vorläufig nicht um das gelegentlich gefundene Albumoid, welches Mörner als Bestandteil des Knorpels nur der ausgewachsenen Tiere beschrieb, in der Annahme, daß es höchstens einen sehr geringen Teil des Knorpels ausmachen kann.

Aus der Literatur geht hervor, daß es nicht möglich ist, die Chondroitinschwefelsäure quantitativ und intakt zu extrahieren. Die Säure oder wenigstens der größte Teil derselben, scheint an das Glutin gebunden zu sein und der Eingriff, der zur Spaltung dieser Bindung nötig ist, greift auch immer zugleich die Chondroitinschwefelsäure an. Daher wurde von vorneherein auf Versuche, die auf Extraktion beruhen, verzichtet; wir trachteten vielmehr die Komponenten im gelösten Knorpel mit Hilfe spezifischer Eigenschaften zu bestimmen.

Für das Glutin wurde hiefür der Gesamtstickstoffgehalt und der Stickstoffgehalt der basischen Aminosäuren benützt, über welche in der Literatur genügend Daten vorliegen.

Nicht so sehr sichergestellt scheinen die Verhältnisse bezüglich der Chondroitinschwefelsäure. Hier haben wir uns auf die Arbeiten von Levene gestützt und es ergab sich im Laufe vorliegender Untersuchungen, daß die Resultate sich am besten mit den Vorstellungen, die der genannte Autor von der Konstitution der Chondroitinschwefelsäure entwickelt hat, vereinbaren lassen. Ihnen folgend, ergeben sich eine Reihe von Eigenschaften für den Knorpel, deren quantitative Untersuchung Schlüsse auf die darin vorhandene Menge Chondroitinschwefelsäure zulassen, nämlich Schwefel-, Stickstoff-, Glukosaminbestimmungen, Messung von Essigsäure, Furfurol, Reduktion. Die Schwierigkeiten liegen dann im Eruieren der Bedingungen, unter welchen diese Eigenschaften quantitativ meßbar in Erscheinung treten.

---

# II. Beschreibung der Versuche.

## 1. Behandlung des Materials.

Als Ausgangsmaterial wurden Nasenscheidewände des Schweines verwendet, die mir vom städtischen Schweineschlachthaus in Wien, St. Marx, in freundlichster Weise geliefert wurden. Diese befreite ich mit dem Messer vollständig von Knochenresten und fleischigen Häuten; dann wurden die feinen, durchsichtigen Häute, die unmittelbar auf der Knorpelsubstanz liegen, abgeschabt. Um die mühsame und zeitraubende Arbeit etwas zu erleichtern, ist es sehr vorteilhaft, die einzelnen Scheidewände ganz — unzerschnitten — in der Hand zu haben. Erst jetzt werden die Wände zerschnitten und mit dem Wiegemesser ganz fein zerhackt. Die so zerkleinerte Masse ließ ich mehrere Tage im Wasser liegen, welches wiederholt gewechselt wurde, um das Blut, das sich an einzelnen Stellen im Innern der Scheidewände befindet, auszuwaschen. Dann wurde abgesiebt — am besten durch ein nicht allzudichtes Tuch — und die Substanz in einer geräumigen Porzellanschale bei 105° getrocknet. Bei dieser Temperatur nimmt das Trocknen von 50 bis 60 g Substanz (trocken) allerdings einige Tage in Anspruch, aber bei höherer Temperatur tritt sehr leicht Zersetzung ein, was sich an der Dunkelfärbung der Substanz und dem widerlichen Geruch von Zersetzungsprodukten erkennen läßt. Die Masse darf höchstens ganz hell bräunlich gefärbt sein. Sie wird bis zur Verwendung im Exsikkator aufbewahrt. Das Trocknen ist deshalb unbedingt nötig, da die nativen Scheidewände beim Liegenlassen ihr Gewicht durch Wasserabgabe verändern.

## 2. Bestimmung des Schwefels.

### a) Gesamtschwefel.

Die Bestimmungen erfolgten nach der Methode von Asboth.[1])

1. Einwage 0.500 g. Gefunden: 0.1218 g $BaSO_4$ oder 0.0167 g S, entsprechend 3.34% der Trockensubstanz.

2. Einwage 0.700 g. Gefunden: 0.1688 g $BaSO_4$ oder 0.0232 g S, entsprechend 3.31% der Trockensubstanz.

3. Einwage 0.500 g. Gefunden: 0.1167 g $BaSO_4$ oder 0.0160 g S, entsprechend 3.21% der Trockensubstanz.

Mittelwert: 3.29% Schwefel.

---

[1]) Chemikerztg. 19/2040, 1895.

b) Abspaltbarer Schwefel.

Eine gewogene Menge Knorpeltrockensubstanz wurde am Rückflußkühler mit Salzsäure erhitzt. Maximale und konstante Werte fanden sich bei Verwendung von konzentrierter Säure. Nach der Hydrolyse wurde filtriert und im Filtrat Sulfation in üblicher Weise mit Bariumchlorid bestimmt.

1. Einwage 1.500 g. Hydrolysendauer 8 Stunden. Gefunden 0.2961 g $BaSO_4$ oder 0.0406 g S, entsprechend 2.71% S.

2. Einwage 1.500 g. Hydrolysendauer 10 Stunden. Gefunden 0.2830 g $BaSO_4$ oder 0.0388 g S, entsprechend 2.59% S.

3. Einwage 2.001 g. Hydrolysendauer 50 Stunden. Gefunden 0.3523 g $BaSO_4$ oder 0.0484 g Schwefel, entsprechend 2.42% S.

4. Einwage 2.001 g. Hydrolysendauer 18 Stunden. Gefunden 0.3566 g $BaSO_4$ oder 0.0490 g Schwefel, entsprechend 2.45% S.

5. Einwage 2.0015 g. Hydrolysendauer 19 Stunden. Gefunden 0.3758 g $BaSO_4$ oder 0.0516 g S, entsprechend 2.58% S.

Als Mittel ergibt sich daraus

**2.55%** abspaltbarer Schwefel.

### 3. Stickstoffbestimmungen.

a) Gesamtstickstoff.

Die Bestimmungen wurden nach Kjeldahl vorgenommen, zwei nach der gewöhnlichen älteren Methode, eine nach der Modifikation für Mikrobestimmungen nach Parnass-Wagner.[2]) Als Indikator gelangte Methylrot zur Anwendung, das auf Gelb titriert wurde.

1. Einwage 1.0005 g. Verbraucht 62.7 $cm^3$ $H_2SO_4$ n/10, entsprechend 0.0878 g Stickstoff oder 8.78% Stickstoff.

2. Einwage 1.0010 g. Verbraucht 63.9 $cm^3$ $H_2SO_4$ n/10, entsprechend 0.0894 g Stickstoff oder 8.94% Stickstoff.

3. Einwage 10.420 mg. Verbraucht 4.65 $cm^3$ $H_2SO_4$ 0/70, entsprechend 0.00098 g Stickstoff oder 8.92% Stickstoff.

Mittelwert: Die Trockensubstanz enthält

**8.88%** Stickstoff.

b) Lockerer Stickstoff.

Der Trockenknorpel wurde durch mehrstündiges Kochen in verdünnter Salzsäure (zirka 3%ig) in Lösung gebracht, die Flüssigkeit bis zur schwach sauren Reaktion mit Natronlauge versetzt und mit Magnesia im Kjeldahl-Apparat destilliert.

1. Einwage 3.000 g. Verbraucht 25.71 $cm^3$ $H_2SO_4$ n/10, entsprechend 0.0360 g Stickstoff oder 1.20% der Trockensubstanz.

---

[2]) Pregl: Die quantitative organische Mikroanalyse. 3. Aufl., S. 120 ff., 1930.

2. Einwage 3.001 g. Verbraucht 28.0 cm³ $H_2SO_4$ n/10, entsprechend 0.0392 g Stickstoff oder 1.29% der Trockensubstanz.

3. Einwage 3.001 g. Verbraucht 26.65 cm³ $H_2SO_4$ n/10, entsprechend 0.0373 g Stickstoff oder 1.28% der Trockensubstanz.

Mittelwert: 1.26% der Knorpelsubstanz oder 14.19% des Gesamtstickstoffes sind locker gebundener Stickstoff.

In diesem Zusammenhange wurde untersucht, ob Glukosamin unter den gleichen Bedingungen solchen lockeren Stickstoff abzugeben imstande ist.

Einwage 2.500 g Glukosaminhydrochlorid (Kahlbaum), die zu 25 cm³ gelöst wurden.

Reinheitsprüfung (Stickstoff): je 0.5 cm³ wurden nach der Mikro-Kjeldahl-Methode untersucht.

1. Verbraucht 16.35 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.00327 g N, pro 25 cm³ 0.1635 g N.

2. Verbraucht 16.25 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.00325 g N, pro 25 cm³ 0.1625 g N.

Mittelwert: 0.1630 g N.

Berechnet: 0.1624 g N.

1 cm³ der Lösung wurde nun mit einigen Tropfen verdünnter Lauge fast neutralisiert und in einen Destillationskolben gegeben. Nach Zugießen eines reichlichen Ueberschusses von Magnesiaaufschlämmung in Wasser wurde destilliert. Das Ende des Kühlrohres tauchte in vorgelegte n/70 Säure ein. Es ergaben sich folgende Werte:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Destillationsdauer in Min. . . | 30 | 90 | 120 | 170 | 230 |
| Verbrauchte Säure in cm³ . . | 4.50 | 3.40 | 1.05 | 0.75 | 0.35 |
| Total verbrauchte Säure in cm³ | 4.50 | 7.90 | 8.95 | 9.70 | 10.05 |

10.05 cm³ n/70 Säure entspricht 0.00201 g N; pro Einwage wurden also gefunden 0.050 g N.

Unter den Gegebenen wird vom Amidorest des Glukosamins 2% N abgespalten, was zirka ein Drittel des Gesamtglukosaminstickstoffs entspricht.

### c) Glutin-Stickstoff.

10.000 g Knorpeltrockensubstanz wurden während 24 Stunden durch Einlegen in sehr verdünnte Salzsäure gequollen und dann im Dialysiersack so lange gewaschen, bis die saure Reaktion verschwunden war. Das Produkt kochte ich am Rückflußkühler zirka 20 Stunden mit Wasser, wobei sich eine bräunliche Lösung (Chondrinlösung) bildete.

Es blieben 0.70 g ungelöst. Dieser Rückstand war dunkel gefärbt, feinkörnig und ließ kleine Fäserchen erkennen.

Die Lösung wurde auf 500 cm³ gebracht. Sie reagierte wie folgt auf Eiweißfällungsmittel: Mit Trichloressigsäure keine sicht-

bare Reaktion, mit Phosphor-Wolframsäure starke Trübung, die mit Säure flockt und sich in Lauge löst (im Filtrat davon Molisch-Reaktion positiv, und zwar rotvioletter Ring und unter diesem Grünfärbung); mit Alkohol-Azeton spärliche Trübung; mit Tannin Flockung; mit wässeriger Pikrinsäure dichte Trübung, mit alkoholischem Niederschlag, im Ueberschuß löslich; mit Sublimat geringe Trübung, auf Zusatz von Säure oder Kochsalz kein Unterschied; mit Merkurinitrat und -Azetat voluminöse Niederschläge; mit Quecksilbersulfat, ebenso mit Kupferazetat keine sichtbare Reaktion; mit Bleiazetat Niederschlag, dagegen mit Kalium-Ferrozyanid + Essigsäure keine sichtbare Reaktion. Reaktion von Molisch stark positiv.

Gesamtstickstoff der Chondrinlösung: Zweimal je 2 cm³ der Lösung wurden verascht und der Ammoniak im Parnass-Wagner-Apparat überdestilliert.

1. Verbraucht 15.6 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.00312 g Stickstoff; pro 500 cm³ 0.780 g Stickstoff.

2. Verbraucht 15.53 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.00310 g Stickstoff; pro 500 cm³ 0.776 g Stickstoff.

Mittelwert 0.778 g N. Zwei Kontrollbestimmungen ergaben denselben Mittelwert. Also sind von 100 g Trockensubstanz 7.78 g Stickstoff auf diese Weise löslich.

Die Bestimmung des Glutinstickstoffs führte ich nun wie folgt aus:

Zweimal je 25 cm³ der Chondrinlösung wurden bei stark salzsaurer Reaktion mit Phosphor-Wolframsäure (konzentrierte Lösung in Wasser) gefällt, die Niederschläge auf gehärtete Filter abgesaugt, sehr gründlich ausgewaschen mit einer Waschflüssigkeit, die aus Wasser mit etwas salzsaurer Phosphorwolframsäurelösung bestand. (Die Untersuchung der Filtrate siehe sub d.) Die Niederschläge brachte ich dann samt Filter quantitativ je in einen Kjeldahl-Kolben und spülte Anhaftendes von der Nutsche nach. Dann wurde wie üblich verascht und der Ammoniak im Destillat titrimetrisch bestimmt (Methylrot).

1. Verbraucht 24.06 cm³ n/10 Säure, entsprechend 0.03368 g Stickstoff; pro 500 cm³ 0.6737 g Stickstoff.

2. Verbraucht 24.29 cm³ n/10 Säure, entsprechend 0.03400 g Stickstoff; pro 500 cm³ 0.6801 g Stickstoff.

Mittelwert 0.6769 g Stickstoff; das heißt im Trockenknorpel sind 6.77% Glutinstickstoff.

### d) Chondroitinstickstoff.

Die Stickstoffbestimmung in dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung der Chondrinlösung erfolgte so, daß je 2 cm³ der auf 100 cm³ verdünnten Filtrate nach der Mikro-Kjeldahl-Methode untersucht wurden.

1. Verbraucht 0.66 $cm^3$ n/70 Säure, entsprechend 0.000132 g Stickstoff, pro 100 $cm^3$ Filtrat. 0.0066 g Stickstoff; pro 500 $cm^3$ Chondrinlösung 0.132 g Stickstoff.

2. Verbraucht 0.66 $cm^3$ n/70 Säure; pro 500 $cm^3$ Chondrinlösung 0.132 g Stickstoff.

Danach sind also **1.32%** der Knorpelsubstanz Chondroitinstickstoff.

Um darüber Klarheit zu gewinnen, ob sich im Filtrat der Glutinfällung tatsächlich Chondroitinschwefelsäure befindet, wurden folgende Untersuchungen vorgenommen: Von zirka 20 g Knorpel wurde eine Chondrinlösung hergestellt, wie bei der Bestimmung des Glutinstickstoffs (siehe S. 35 u. f.). Es war fünftägiges Kochen mit Wasser und zweimaliges Quellen in Salzsäure nötig, um die Hauptmenge in Lösung zu bringen. Auch ist die Verwendung eines sehr geräumigen Kolbens geboten, da die Lösung stark stößt. Daß dabei Verluste durch festes Ankleben von fortgestoßenen Knorpelteilchen in den oberen Teilen der Gefäße eintreten, kann wohl schwerlich ganz vermieden werden.

Die braune Lösung wurde salzsauer mit Phosphorwolframsäure gefällt; vom Niederschlag wurde nach drei Tagen abgesaugt, das Filtrat durch viermaliges Ausschütteln mit Aether-Amylalkohol (1:1) von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit, was durch Ausbleiben der Blaufärbung mit wässeriger Harnsäure konstatiert wurde. Dann wurde auf dem Wasserbade bis auf 1000 $cm^3$ eingedampft.

### α) Abspaltbarer Schwefel:

50 $cm^3$ der Chondrinlösung wurden auf dem Wasserbade eingedampft, in konzentrierter Salzsäure aufgenommen, in einen Rundkolben gespült und am Rückflußkühler 20 Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht. Nach Filtration wurde kochend mit Bariumchlorid gefällt und das Sulfat wie üblich zur Wägung gebracht.

1. Gefunden 0.1573 g $BaSO_4$, entsprechend 0.0216 g S. Pro 1 Liter also 0.432 g S.

2. Gefunden 0.1559 g $BaSO_4$, entsprechend 0.0214 g S. Pro 1 Liter also 0.428 g S.

In 1000 $cm^3$ der enteiweißten Chondrinlösungen finden sich also **0.430 g** abspaltbarer Schwefel.

### β) Freies Sulfation:

50 $cm^3$ der Lösung wurden direkt mit Bariumchlorid versetzt und das ausgefallene Sulfat wie üblich zur Wägung gebracht.

Gefunden 0.1139 g $BaSO_4$, entsprechend 0.0156 g S. Pro 1 Liter also 0.3129 g S.

Das heißt: **72.76%** des Schwefels der Aetherschwefelsäure sind schon bei der beschriebenen Herstellung der Lösung abgespalten worden.

γ) Reduktionsmessung:

Maximale Reduktion ergab sich bei folgender Versuchsanordnung: 20 $cm^3$ der Lösung wurden 2%ig salzsauer zirka zehn Stunden lang hydrolysiert und dann nach Bertrand (siehe S. 32) gemessen.

Verbraucht (Mittelwert von zwei Versuchen): 12.4 $cm^3$ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 78.9 mg Kupfer, welche nach Bertrand 40.7 mg Glukose entsprechen; pro 1 Liter also 2.035 g Glukose.

δ) Gesamtstickstoff:

20 $cm^3$ der Lösung wurden, um restliche Aminosäuren auszufällen, mit Quecksilberazetat bei sodaalkalischer Reaktion versetzt (dies erwies sich hier im Gegensatz zu den auf S. 25 ff. beschriebenen Versuchen als notwendig; offenbar wurden infolge des andauernden Kochens mit Wasser einzelne Aminosäuren aus dem Verbande des Glutins gelöst). 2 $cm^3$ des auf 25 gebrachten Filtrates werden nach der Mikro-Kjeldahl-Methode analysiert.

Verbraucht (im Mittel von zwei Versuchen): 1.25 $cm^3$ n/70 Säure, entsprechend 0.25 mg Stickstoff. Die ganze Lösung enthält also 0.156 g Stickstoff.

ε) Nach Van Slyke bestimmbarer Stickstoff:[3])

40 $cm^3$ der Lösung wurden 5%ig salzsauer, zirka 40 Stunden lang hydrolysiert, mit Quecksilberazetatlösung und Soda bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, filtriert und auf 50 $cm^3$ gebracht. Je 10 davon wurden im Van Slyke-Apparat analysiert.

1. Blindwert 0.6 $cm^3$. Ablesungen: 1.95 $cm^3$ Gas. Temperatur 22°, Barometerstand 742 mm. Das entspricht reduziert 0.00104 g Stickstoff; pro 1000 $cm^3$ 0.1300 g Stickstoff.

2. Blindwert 0.5 $cm^3$. Ablesungen: 1.89 $cm^3$ Gas. Temperatur 22°, Barometerstand 742 mm. Die Reduktion ergibt 0.00101 g Stickstoff; pro 1000 $cm^3$ 0.1263 g Stickstoff.

Mittelwert **0.128 g** Aminostickstoff pro Liter.

ς) Glukosaminbestimmung:

Methode siehe S. 34.

20 $cm^3$ der Chondrinlösung wurden 5%ig salzsauer über Nacht hydrolysiert, filtriert und auf 50 $cm^3$ verdünnt. Je 10 $cm^3$ davon wurden nach Zuckerkandl-Messiner untersucht.

---

[3]) Siehe z. B. Houben: 2. Aufl., **4**, S. 463.

Gefunden:

1. 2.3 mg Glukosaminchlorhydrat,
2. 2.2 mg Glukosaminchlorhydrat,
3. 2.5 mg Glukosaminchlorhydrat.

Mittel 2.3 mg Glukosaminchlorhydrat, entsprechend 1.94 mg freies Glukosamin; pro 1000 cm³ 0.485 g freies Glukosamin.

Auch ohne Hydrolyse war die Glukosaminreaktion stark positiv; ebenso auch ohne Azetylierung.

η) Optische Aktivität:

Sowohl die Chondrinlösung selbst als auch ihr Hydrolysat mit 5%iger Salzsäure wurden optisch aktiv, und zwar schwach rechtsdrehend gefunden. Die Drehung wurde nach Hydrolyse mit stärkeren Säuren schwächer und schließlich Null.

Die Messungen wurden nach Ausfällung restlicher Aminosäuren mit Quecksilberazetat und — nur bei stark sauren Hydrolysaten — nach Entfärben mit Tierkohle ausgeführt.

e) Rückstandstickstoff.

7% der Trockensubstanz blieben bei der Herstellung der Chondrinlösung ungelöst (siehe S. 25). In diesem Rückstand wurde der Stickstoff nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt.

1. Einwage 5.688 mg. Verbraucht 5.5 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.0011 g Stickstoff oder 19.39%.
2. Einwage 3.167 mg. Verbraucht 3.17 cm³ n/70 Säure, entsprechend 0.000634 g Stickstoff oder 20.02%.

Mittel: 19.66% Stickstoff des Rückstandes oder 1.37% des Trockenknorpels.

f) Glutin-Basenstickstoff.

Die durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoffsubstanz des Knorpelglutinhydrolysates wurde wie folgt bestimmt: Der Knorpel kochte am Rückflußkühler 20 bis 30 Stunden mit konzentrierter Salzsäure. Das Hydrolysat wurde nach Filtration unter vermindertem Druck bei zirka 60° eingedampft, in Wasser gelöst und wieder ebenso zur Trockene konzentriert. Dann wurde in Wasser aufgenommen, filtriert und mit heißem Wasser gut nachgewaschen. Das Filtrat versetzte ich bis zur schwachsauren Reaktion mit Natronlauge und destillierte mit einem Ueberschuß von Magnesia, bis kein Ammoniak mehr überging, was ich durch Titration von vorgelegter Säure feststellte. Der Rückstand wurde filtriert und auf 200 cm³ gebracht.

Je 50 cm³ davon wurden mit 10 cm³ Wasser versetzt, mit etwas konzentrierter Salzsäure angesäuert, mit einer konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung versetzt (Vermeidung eines

allzugroßen Ueberschusses durch Tüpfeln gegen Chininlösung) und zwei Tage lang stehen gelassen. Letzteres erwies sich, wie die Vorversuche ergaben, als unumgänglich notwendig, da sich sonst immer noch nachträglich Niederschlag absetzt, der Stickstoff enthält.

Der Niederschlag wurde auf ein gehärtetes Filter gesaugt und im übrigen wie früher (S. 26) behandelt.

Bei einer Einwage von 10.000 g Knorpel ergaben sich so folgende Werte:

1. Verbraucht 32.94 $cm^3$ n/10 Säure, entsprechend 0.04616 g Stickstoff, also 1.846 % der Trockensubstanz.

2. Verbraucht 31.36 $cm^3$ n/10 Säure, entsprechend 0.0438 g Stickstoff, also 1.752 % der Trockensubstanz.

3. Verbraucht 32.2 $cm^3$ n/10 Säure, entsprechend 0.0451 g Stickstoff, also 1.803 % der Trockensubstanz.

4. Verbraucht 31.98 $cm^3$ n/10 Säure, entsprechend 0.0448 g Stickstoff, also 1.791 % der Trockensubstanz.

Mittelwert: Von der Trockensubstanz sind 1.80 % Basenstickstoff.

### 4. Bestimmung flüchtiger Säure.

Die Einwage wurde mit zirka 5 %iger Salzsäure oder Schwefelsäure hydrolysiert. Diese Azidität ergab Maximalwerte. Sowohl bei Verwendung von wesentlich verdünnterer als auch konzentrierterer Säure ergaben sich kleinere und inkonstantere Resultate.

Das Hydrolysat wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen, bei salzsaurer Hydrolyse nach Neutralisation und Ansäuern mit Phosphorsäure. Das Destillat wurde unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator titriert.

Den Nachweis, daß sich im Wasserdampfdestillat Essigsäure befindet, erbrachte ich auf folgende Weise:

Zirka 6 g Knorpel wurden 15 Stunden lang hydrolysiert. Das Wasserdampfdestillat davon neutralisierte ich mit Lauge durch Tüpfeln auf Lakmuspapier und dampfte bis auf ein kleines Volumen ein. Genau neutral wurde mit Silbernitrat in konzentrierter Lösung gefällt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen und aus Wasser mehrmals umkristallisiert.

Das Gewicht der Kristallmasse betrug 0.1714 g und sie hatte einen Glührückstand von 0.1107 g oder 64.59 %, während sich für Silberazetat ein Glührückstand von 64.64 % errechnet.

Die Bestimmungen der gesamten flüchtigen Säure ergaben folgende Werte:

1. Einwage 2.509 g Trockenknorpel. Hydrolyse mit Salzsäure, zirka 5 %ig, während 16 Stunden.

Verbraucht 28.6 $cm^3$ NaOH n/10; pro 100 g Knorpel also 1139.9 $cm^3$ NaOH n/10.

2. Einwage 3.001 g Trockenknorpel. Hydrolyse mit Salzsäure, zirka 5%ig, während 48 Stunden.

Verbraucht 34.1 cm³ NaOH n/10; pro 100 g Knorpel also 1136.3 cm³ NaOH n/10.

3. Einwage 3.000 g Trockenknorpel. Hydrolyse mit Schwefelsäure, zirka 5%ig, während 40 Stunden.

Verbraucht 33.0 cm³ NaOH n/10; pro 100 g Knorpel also 1100.0 cm³ NaOH n/10.

4. Einwage 3.001 g Trockenknorpel. Hydrolyse mit Salzsäure, zirka 5%ig, während 94 Stunden.

Verbraucht 34.7 cm³ NaOH n/10; pro 100 g Knorpel also 1156.3 cm³ NaOH n/10.

5. Einwage 3.0005 g Trockenknorpel. Hydrolyse mit Schwefelsäure, zirka 5%ig, während 94 Stunden.

Verbraucht 34.0 cm³ NaOH n/10; pro 100 g Knorpel also 1133.1 cm³ NaOH n/10.

Mittelwert: 100 g Knorpel liefern **1133.1** cm³ n/10 flüchtige Säure.

In dem Destillat befindet sich außer Essigsäure noch Ameisensäure, und zwar nur diese, was aus folgendem erhellt:

1. Es ist bekannt, daß aus Kohlehydraten, insbesondere auch aus Glukuronsäure [4]) und aus Glukosamin [5]) durch Behandeln mit Mineralsäure Ameisensäure entsteht.

2. Das Wasserdampfdestillat besitzt die Fähigkeit, nach Konzentration bei neutraler Reaktion aus Silbernitratlösung Silber abzuscheiden. Daher mußte der Niederschlag von Silberazetat mehrmals umkristallisiert werden.

3. Das Wasserdampfdestillat besitzt die Fähigkeit, Kaliumpermanganatlösung zu reduzieren.

4. Die Silbersalze anderer, höherer Fettsäuren sind schwer löslich, so daß sie, wenn solche Säuren im Destillat enthalten wären, mit dem Silberazetat zusammen ausfallen würden. Daß dies nicht der Fall ist, dürfte durch vorstehende Silbersalzanalyse (S. 30) eindeutig bewiesen sein.

Die Eigenschaft, Permanganat zu reduzieren, wurde zur quantitativen Bestimmung der Ameisensäure verwendet: [6])

Hydrolyse (durchwegs mit Schwefelsäure, zirka 5%) und Destillation, wie bei der Bestimmung der gesamten flüchtigen Säure (siehe S. 30). Das Destillat wurde mit Soda in Substanz bis zur alkalischen Reaktion versetzt, erwärmt und mit n/10 Kaliumpermanganatlösung titriert. Meist ging das Zusammenballen des ausgeschiedenen Braunsteins trotz Wasserbadtempe-

---

[4]) Z. physiol. Chem., **5**, S. 388, 1881.

[5]) Z. physiol. Chem., **5**, S. 387, 1881.

[6]) Treadwell: Lehrbuch, **2**, S. 481, 4. Aufl.

ratur nicht so glatt von statten, wie man nach der Vorschrift glauben möchte, sondern es blieb kolloidal gelöst. Um den Endpunkt der Titration doch scharf erkennen zu können, mußte die Titration vorher unterbrochen, die Lösung gekocht und eventuell filtriert werden. Dann erst war das Bestehenbleiben der Rotfärbung deutlich zu erkennen.

In Vorversuchen hatten wir festgestellt, daß eine alkalische Natriumazetatlösung auch in der Hitze Kaliumpermanganat nicht zu entfärben vermag.

Wir erhielten folgende Werte:

1. Einwage 3.002 g Knorpel.

Verbraucht 23.2 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 0.0320 g Ameisensäure, welche verbrauchen 6.96 cm³ NaOH n/10. Die Ameisensäure aus 100 g Knorpel verbraucht also 231.8 cm³ NaOH n/10.

2. Einwage 3.000 g Knorpel.

Verbraucht 22.2 cm³ $KMnO_4$ n/10. Entsprechend 0.0309 g Ameisensäure, welche verbrauchen 6.72 cm³ NaOH n/10. Die Ameisensäure aus 100 g Knorpel verbraucht also 224.0 cm³ NaOH n/10.

3. Einwage 3.001 g Knorpel.

Verbraucht 24.3 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 0.0335 g Ameisensäure, welche verbrauchen 7.28 cm³ NaOH n/10. Die Ameisensäure aus 100 g Knorpel verbraucht also 242.2 cm³ NaOH n/10.

Im Mittel werden danach aus 100 g Knorpeltrockensubstanz unter obigen Bedingungen 1.0704 g Ameisensäure gebildet, welche 232.7 cm³ NaOH n/10 entsprechen.

### 5. Reduktionsmessung.

Knorpelhydrolysate wurden filtriert, ihre Reduktionskraft nach Bertrand[7]) gemessen und als Glukose berechnet. Die umfassenden Versuche ergaben, daß nur bei Anwendung von zirka 5% Säure und bei einer Hydrolysendauer von 20 bis 30 Stunden einigermaßen konstante Werte erreicht werden können.

1. Einwage 0.200 g Knorpel.

Verbraucht 12.6 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 80.14 mg Kupfer, welche nach Bertrand 41.5 mg Glukose ergeben, also 20.7% der Trockensubstanz.

2. Einwage 3.00 g Knorpel. Das Hydrolysat wurde auf 500 cm³ gebracht und je 20 cm³ davon untersucht.

---

[7]) Siehe Barrenscheen und Willheim: „Laboratoriumsmethoden der Wiener Kliniken", S. 544.

Verbraucht 7.75, bzw. 7.85 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend (im Mittel) 49.61 mg Kupfer, welche nach Bertrand 25.0 mg Glukose ergeben, also 20.8% der Trockensubstanz.

3. Einwage 0.201 g Knorpel.

Verbraucht 13.0 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 82.68 mg Kupfer, welche nach Bertrand 42.8 mg Glukose ergeben, also 21.29% der Trockensubstanz.

4. Einwage 10.001 g Knorpel. Das Hydrolysat wurde auf 100 cm³ gebracht und je 2 cm³ davon (nach zirka zehnfacher Verdünnung) analysiert.

Verbraucht 12.50, bzw. 12.20 cm³ $KMnO_4$ n/10, entsprechend 78.23 mg Kupfer, welche nach Bertrand 40.4 mg Glukose ergeben, also 22.20% der Trockensubstanz.

Mittelwert: 100 g Knorpel haben nach Hydrolyse dieselbe Reduktionskraft wie **21.5 g** Glukose.

Durch Zusatz von Zinnchlorür bei der Hydrolyse zur Verminderung der Melaninbildung konnten keine höheren Werte gefunden werden.

Alkalische Hydrolyse mit ½ bis 5%igem Alkali ergab Werte, die mindestens fünf- bis zehnmal niedriger waren als obige.

### 6. Versuche zur direkten Bestimmung der Glukuronsäure.

Die Trockensubstanz wurde im Fraktionierkolben mit zirka 20% Salzsäure am absteigenden Kühler destilliert, bis kein Furfurol mehr überging. Das Destillat versetzte ich mit Phloroglucin, ließ mindestens 12 Stunden stehen, filtrierte, wusch, trocknete und wog unter Luftabschluß.

Trotz sehr zahlreicher Versuche waren auch nur annähernd konstante Werte nicht zu erreichen; die Werte schwanken zwischen Null und den unten verzeichneten Maximalzahlen, ohne daß es mir gelungen wäre, die Bedingungen dafür aufzufinden. Aenderung der Versuchsanordnung, insbesondere zum Beispiel Salzsäuredestillation von Hydrolysaten, ergab stets geringere oder gar keine Ausbeute an Furfurolphlorogluzid.

1. Einwage 5.001 g. Gefunden 0.0917 g Phlorogluzid, entsprechend 0.2751 g Glukuronsäurelakton oder 0.3032 g Glukuronsäure; das sind 6.01% des Knorpels.[8])

2. Einwage 3.000 g. Gefunden 0.0853 g Phlorogluzid, entsprechend 0.2559 g Glukuron oder 0.2820 g Glukuronsäure; das sind 9.48% des Knorpels.

3. Einwage 5.001 g. Gefunden 0.1059 g Phlorogluzin, entsprechend 0.3177 g Glukuron oder 0.3502 g Glukuronsäure; das sind 7.00% des Knorpels.

---

[8]) Berechnung s. Lefèvre und Tollens: B. 40/4513, 1907.

### 7. Versuche zur Bestimmung des Glukosamins.

Die Bestimmungsmethode von Zuckerkandl-Messiner[9]) wurde für Knorpelhydrolysate wie folgt angewendet:

Knorpel wurde mit 5% Salzsäure über Nacht gekocht. Das Hydrolysat nach Entfärben und Auswaschen der Tierkohle auf dem Wasserbade eingedampft, mit 5%igem Natriummethylat verrieben, um das Glukosamin freizumachen und unter Kühlung tropfenweise mit Essigsäureanhydrid azetyliert. Nach Verdünnen mit Wasser wurden Alkohol und konzentriertes Alkali bis zur stark alkalischen Reaktion zugesetzt, zwecks Ringbildung kurz aufgekocht und nach Abkühlung mit Ehrlichs Reagens versetzt und die entstandene Färbung nach fünf Minuten kolorimetrisch mit einer frisch bereiteten Standardlösung von Glukosaminhydrochlorid verglichen.

1. 5 $cm^3$ Hydrolysat, enthaltend 0.5 g Substanz, wurden auf 50 $cm^3$ verdünnt. In 3 $cm^3$ dieser Lösung wurden 2.88 mg Glukosaminazetat oder 2.34 mg Glukosamin gefunden, entsprechend 7.7%.

2. In 2 $cm^3$ obiger Lösung wurden 1.8 mg Azetat oder 1.46 mg Glukosamin gefunden, entsprechend 7.3%.

3. 5 $cm^3$ Hydrolysat, enthaltend 0.25 g Substanz, wurden wie oben behandelt. In 3 $cm^3$ Lösung wurden 1.44 g Azetat oder 1.17 mg Glukosamin gefunden, entsprechend 7.7%.

Als Mittel ergibt sich danach ein Glukosamingehalt von 7.5% des Trockenknorpels.

Bei Hydrolyse unter anderen Bedingungen ergaben sich stets schwankende und niedrigere Werte.

### 8. Aschebestimmung.

Die Einwage wurde im Porzellantiegel sehr langsam über kleiner Flamme verbrannt. Nach erfolgter Absengung wurde stärker erhitzt und nach einer Unterbrechung zur Hinzufügung einiger Tropfen konzentrierter Salpetersäure bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Es blieb rein weiße Substanz zurück.

1. Einwage 0.2072 g Trockenknorpel.
Gefunden 0.0203 g Asche oder 9.79%.
2. Einwage 0.2787 g Trockenknorpel.
Gefunden 0.0271 g Asche oder 9.72%.

Mittelwert: Die Trockensubstanz des Knorpels enthält 9.76% Asche.

---

[9]) Biochem. Z., 236/19, 1931.

# III. Besprechung der Resultate.

## A. Glutin.

Unter den im vorhergehenden Kapitel aufgezeichneten Resultaten finden sich zwei, die einen Rückschluß auf die Menge vorhandenen Glutins zulassen, nämlich:

a) Glutinstickstoffbestimmung (S. 25 ff.),
b) Basenstickstoffgewinnung (S. 29 ff.).

### a) Glutinstickstoffbestimmung.

Ueber den Gesamtstickstoff des Glutins liegen eine große Anzahl Zahlen vor;[1]) die Werte schwanken zwischen 16 und 18.7%, sind aber für Nasenglutin oder Glutein, wie es vielfach genannt wird, immer etwas niedriger als gewöhnlich gefunden worden. Sadikoffs[2]) gründliche Untersuchungen über letzteres ergeben für umgefälltes Glutein Werte, die zwischen 16.9 und 17.1% liegen, so daß wir hier einen Wert von 17.0% in Rechnung ziehen.

Da im Knorpel ein Gesamtglutinstickstoffgehalt von 6.77% gefunden wurde, ergibt sich daraus, daß die Trockensubstanz des Knorpels einen Gehalt an Glutin von **39.82%** besitzt.

### b) Basenstickstoffbestimmung.

Die Angaben über den Gehalt des Leims an basischen Aminosäuren variieren ebenfalls sehr stark. Deshalb hat sich Thimann[3]) neuerdings die Aufgabe gestellt, die Diskrepanzen zwischen den Werten verschiedener Autoren zu erklären und dies auch in befriedigender Weise erreicht. Neben verschiedenen Faktoren von geringerem Einfluß, wie Fällungstemperatur, Qualität der Phosphorwolframsäure, Vorbehandlung des Eiweißes vor der Hydrolyse u. a. m. fand der genannte Autor, daß die Menge Stickstoff, die durch Phosphorwolframsäure aus dem Gelatinehydrolysat gefällt wird, weitgehendst von der Gesamtstickstoffkonzentration vor der Fällung abhängig ist. Bildet man eine Kurve so, daß man als Abszisse die Milligramm Stickstoff pro Kubikzentimeter Hydrolysat und als Ordinate die Prozente

---

[1]) Siehe zum Beispiel Biochem. Handlexikon, **4**, S. 181 ff. (1911) oder Oppenheimers Handb., **1**, S. 675.

[2]) l. c.

[3]) Biochem. J., 24/357, 1930.

Stickstoff, die durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, aufträgt, so durchläuft die Kurve ein Maximum.

Wir haben bei unseren Fällungen diesbezüglich Bedingungen eingehalten, die in unmittelbarer Nähe des von Thimann gefundenen Maximums liegen, da eventuelle Versuchsfehler oder kleine Ungenauigkeiten hier die geringsten Fehler zur Folge haben, weil die Kurve relativ flach verläuft.

In diesem Bereiche hat Thimann folgende Werte gefunden:

| | | | |
|---|---|---|---|
| mg N in 10 cm³ Lösung: . . . . . | 16.77 | 27.19 | 38.86 |
| % Diamino-N (des Gesamt-N): . . . | 23.34 | 24.53 | 22.48 |

Wir hielten bei unseren Versuchen eine Stickstoffkonzentration von zirka 25 mg Stickstoff pro 10 cm³ Lösung ein, so daß nach Thimann 24% des Gesamtstickstoffs durch Phosphorwolframsäure fällbar sind.

Der Totalstickstoffgehalt der Gelatine beträgt 17% und 24% davon sind also Basenstickstoff; also entsprechen 4.08 g Basenstickstoff 100 g Glutin.

Wir haben im Knorpel im Mittel 1.80% Basenstickstoff gefunden; dieser entspricht also einem Glutingehalt von 44.12%.

— — — —

Das Mittel aus diesen beiden Bestimmungsmethoden ergibt, daß die Trockensubstanz des Knorpels zu

42.0%

aus Glutin besteht.

## B. Chondroitinschwefelsäure.

Die vorstehend aufgezeichneten Analysen lieferten im allgemeinen konstante Endwerte, die nicht wesentlich außerhalb der analytischen Fehlergrenze liegen und diese Werte erlauben uns Schlüsse über die Quantität der Chondroitinschwefelsäure zu ziehen.

Hievon müssen nur die Bestimmungen der Glukuronsäure mittels der Furfurolmethode ausgenommen werden, die nur unkonstante und, wie der Vergleich mit den übrigen Resultaten zeigt, erheblich zu niedrige Werte lieferten. In diesem Zusammenhange sei darauf verwiesen, daß noch vor 25 Jahren sehr namhafte Forscher[4]) überhaupt das Vorkommen von Glukuronsäure im Knorpel bestritten, weil sie auf keine Weise Furfurol zu gewinnen vermochten.

Wir verzichten also darauf, das Resultat dieser Bestimmungen hier zu verwerten.

---

[4]) c. f., S. 12.

Den folgenden Berechnungen wird die Levenesche Formel für Chondroitinschwefelsäure,

$$C_{28}H_{44}O_{29}N_2S_2,$$

zugrunde gelegt, welche ein Molekulargewicht von 936 ergibt als Summe von:

2 Mol. Glukuronsäure,
2 Mol. Aminohexose,
2 Mol. Schwefelsäure,
2 Mol. Essigsäure,
minus 7 Mol. Wasser.

### a) Die Schwefelbestimmungen.

Der durch saure Hydrolyse abgespaltene Schwefel, 2.55% der Trockensubstanz (siehe S. 24 ff.), ergibt einen Gehalt des Knorpels an Chondroitinschwefelsäure von 37.39%.

Es ist nun interessant, daß der Gesamtschwefelgehalt des Knorpels von 3.29% (siehe S. 23) wesentlich höher (um 3.74%) ist, welche Tatsache im Widerspruch zu unseren Erwartungen steht. Wir vermuteten höchstens einen um weniges gegenüber dem abspaltbaren Schwefel höheren Gesamtschwefel, was seinen Grund in dem allerdings problematischen Schwefelgehalt des Gluteins hätte. Dieser Umstand reicht jedoch nicht hin eine solche Diskrepanz zu erklären.

Die Annahme, daß die Abspaltung der Schwefelsäure unvollständig ist, widerspricht sowohl die Art der Hydrolyse als auch die Konstanz der Werte.

Wir betrachten also obigen Wert als Minimalzahl.

### b) Glukosaminbestimmung.

Diese sollte uns keinen direkten Aufschluß über die Menge Chondroitinschwefelsäure geben, sondern sie dient als Maß dafür, wie weit die Hydrolyse mit 5% Salzsäure, wie sie zur Reduktionsmessung verwendet wurde, fortgeschritten ist.

Es dürfte unmöglich sein, die theoretischen Endprodukte der Hydrolyse quantitativ zu erhalten, da einerseits durch Anwendung konzentrierter Säure die Kohelhydrate zerstört werden, was schon äußerlich an der starken Dunkelfärbung und der Melaninabscheidung zu erkennen ist, und anderseits verdünnte Säure nicht Freilegung aller vier reduzierenden Gruppen des Moleküls herbeiführt.

Wir stellen uns vielmehr vor, daß durch 5% Säure die glukosidische Bindung zwischen den zwei Chondrosinmolekülen

leicht hydrolysiert wird, so daß die Aldehydgruppe der Glukuronsäure frei wird und daß durch weitere Einwirkung der Säure auch die Aminohexose bis zu einem gewissen Grade frei wird.

Es war nun möglich, mit der Methode von Zuckerkandl-Messiner (l. c.) zu bestimmen, wie weit dies geschehen ist, da von dieser Reaktion, die eine Ringbildung zur Voraussetzung hat, nur freies Glukosamin erfaßt wird.

### c) Reduktionsmessung.

Wir konstatierten (siehe S. 32 ff.), daß 100 g Knorpel sich so verhalten, wie wenn sie 21.5 g Glukose enthielten.

Ein Mol. Chondrosin vermag nach Hebting 7.6 Mol. Kupferoxyd zu reduzieren. (l. c.).

21.5 g Glukose entsprechen nach Bertrand 42.9 g Kupfer oder 53.6 g Kupferoxyd; das sind 0.673 Mol. Kupferoxyd. Letztere entsprechen nach Hebting 0.0886 Mol. Chondrosin. Da 2 Mol. Chondrosin einem Mol. Chondroitinschwefelsäure entsprechen, ergibt sich für den Trockenknorpel ein Gehalt an Chondroitinschwefelsäure von 41.4%.

Unsere oben entwickelte Vorstellung über den Vorgang der Hydrolyse läßt sich hier wie folgt anwenden:

Die gemessene Reduktionskraft ist die Summe der Reduktionen der beiden Aldehydgruppen der Glukuronsäuremoleküle + dem Reduktionsvermögen der gefundenen 7.5% freier Aminohexose (siehe S. 34 ff.).

Da nach Ledderhose[5]) und Thierfelder[6]) aequimolare Mengen von Glukosamin, Glukuronsäure und Glukose gegenüber Fehlingscher Lösung die gleiche Reduktionskraft zeigen, können wir durch Subtraktion der dem gefundenen Glukosamin aequimolaren Menge Glukose vom Totalreduktionswert diejenige Menge Glukose errechnen, die der im Knorpel vorhandenen Menge Glukuronsäure aequimolar ist.

Die direkte Bestimmung des Glukosamins nach der Methode von Zuckerkandl-Messiner ergab ein Gehalt an freiem Glukosamin von 7.5%, was 7.5% Glukose aequimolar ist. Das auf Glukuronsäure entfallende Reduktionsvermögen entspricht nun der Differenz dieser Werte, das ist 21.5 — 7.5 = 14.0% Glukose.

Die in einem Mol. Chondroitinschwefelsäure enthaltenen 2 Mol Glukuronsäure haben die gleiche Reduktionskraft wie 2 Mol. Glukose. Sonach können wir aus dem gefundenen Glukose-

---

[5]) Z. physiol. Chem., 4/139, 1880.
[6]) Ibidem, 11/400, 1887.

reduktionswert unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Chondroitinschwefelsäure einen Rückschluß auf die Menge vorhandener Chondroitinschwefelsäure ziehen. Aus der Proportion 2 Mol. Glukose: 1 Mol. Chondroitinschwefelsäure ergibt sich für 14.0 g Glukose ein Gehalt der Knorpeltrockensubstanz an Chondroitinschwefelsäure von **36.39**%.

Eine restlose Uebereinstimmung war in Anbetracht der gewaltigen Verschiedenheit des Aufarbeitungsgrades der Analysensubstanz bei Hebting und bei uns und der Unsicherheit, die der Bertrand-Methode trotz aller Vorsicht anhaftet, nicht zu erwarten. Wenn auch der auf Grund Hebtings praktischer Analysen gefundene Wert von 41.4% zweifellos der bessere ist, eben weil er sich auf Versuche und nicht auf Theorien stützt, so scheint doch das auf Grund unserer Ansichten errechnete Resultat diese zu rechtfertigen.

### d) Die Stickstoffbestimmungen.

Der Vergleich der Stickstoffbestimmungen untereinander ergibt folgendes Bild:

Erste Fraktionierung: Der Gesamtstickstoff wurde aufgeteilt in „löslichen Stickstoff" und Rückstandstickstoff.

| | | |
|---|---|---|
| Gesamtstickstoff | | 8.88% |
| löslicher Stickstoff | 7.78% | |
| Rückstandstickstoff | 1.37% | |
| Summe | | 9.15%. |

Zweite Fraktionierung: Der lösliche Stickstoff wurde aufgeteilt in Leimstickstoff und Chondroitinstickstoff.

| | | |
|---|---|---|
| Löslicher Stickstoff | | 7.78% |
| Leimstickstoff | 6.77% | |
| Chondroitinstickstoff | 1.32% | |
| Summe | | 8.09%. |

In beiden Fällen also ein Fehler von 0.3%.

Daß der auf S. 26 ff. bestimmte, durch Phosphorwolframsäure fällbare Chondroitinstickstoff tatsächlich nur dem Chondrosin angehört, scheint durch folgendes bewiesen:

1. In den gemessenen Proben waren Eiweißreaktionen negativ.

2. Die nähere Untersuchung einer enteiweißten Chondrinlösung (S. 27 ff.), bei deren Herstellung nicht eine quantitative Extraktion der Chondroitinschwefelsäure aus dem Knorpel, sondern nur eine qualitative Aufbereitung beabsichtigt war, ergab, daß die Lösung die Eigenschaften zeigt, die von einer Lösung von Chondroitinschwefelsäure, bzw. deren Spaltprodukten, zu erwarten sind.

Die Bestimmungen des nach van Slyke abspaltbaren Stickstoffs und der Reduktion zeigen, wenn man das Vorliegen von Chondrosin annimmt, eine befriedigende Uebereinstimmung:

Die zur Probe verwendeten 20 $cm^3$ Lösung besaßen eine Reduktionskraft entsprechend 40.7 mg Glukose, bei einem auf Grund des van Slyke-Stickstoffs berechneten Sollwert (nach Hebting) von 44.2 mg Glukose.

Berechnung:
Nach van Slyke wurden in 20 $cm^3$ Lösung
0.00256 g Stickstoff gefunden.
$14 : 7.6 = 0.00256 : x$
$x = 0.00139$ Mol. Kupfer, entsprechend
88.36 mg Kupfer oder 44.2 mg Glukose.

Daß der gefundene Wert für abspaltbaren Schwefel von 0.430 g pro Liter den auf Grund des Stickstoffs berechneten Sollwert von 0.092 g pro Liter erheblich übersteigt, besagt nur, daß die Schwefelsäure bei der beschriebenen Prozedur schon sehr bald weitgehend vom Chondrosin getrennt wird, was dadurch bewiesen scheint, daß in der vorliegenden enteiweißten „Chondrinlösung" 73% des gesamten abspaltbaren Schwefels ohne weitere Hydrolyse mit Bariumchlorid ausfällbar sind.

Die Werte für das Glukosamin sind von derselben Größenordnung wie die auf S. 34 ff. gefundenen.

Von besonderer Wichtigkeit erscheint uns die Tatsache, daß hier die Zuckerkandlsche Reaktion auch ohne Azetylierung stets positiv ausfiel. Das beweist eindeutig, daß die Chondroitinschwefelsäure eine am Stickstoff azetylierte Verbindung ist, daß sich Schmiedeberg also mit der noch 1920 geäußerten gegenteiligen Meinung im Irrtum befindet, denn wir halten es für ausgeschlossen, daß unter diesen Bedingungen die Azetylgruppe von einem anderen Atom abgewandert sei und sekundär die Aminogruppe azetyliert habe.

Auch die optische Aktivität spricht für das Vorliegen von Spaltprodukten der Chondroitinschwefelsäure. Während für die Säure selbst l-Drehung angegeben wird,[8]) fand Hebting das Chondrosin r-drehend.[9])

Auf Grund dieser Beobachtungen halten wir uns für berechtigt, den Stickstoff im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung als dem Chondrosin zugehörig anzusprechen.

---

[8]) Alzona, l. c.

[9]) l. c.

Es ergibt sich so aus der Proportion

2 Grammatom Stickstoff : 1 Mol. Chondroitinschwefelsäure =

$$1.32^{10}) : x$$

ein Gehalt des Knorpels an Chondroitinschwefelsäure von **44.12**%.

e) Die Essigsäure.

Wir haben (auf S. 30 ff.) die Summe von Essigsäure und Ameisensäure azidimetrisch bestimmt, ferner die Ameisensäure oxydimetrisch, so daß sich nun die Essigsäure wie folgt errechnen läßt:

Die gesamte flüchtige Säure
aus 100 g Knorpel verbraucht . . . . 1133.1 cm³ NaOH n/10.

Die Ameisensäure
aus 100 g Knorpel verbraucht . . . . 232.7 cm³ NaOH n/10;
also sind . . . . 900.4 cm³

n/10 Essigsäure oder $\left(x = \frac{6 \times 900{,}4}{100}\right)$ 5.40% Essigsäure vorhanden.

— — — —

Die Formel von Levene verlangt 2 Mol. Essigsäure pro 1 Mol. Chondroitinschwefelsäure; also ergibt sich aus der Proportion

$$120 : 936 = 5.4 : x$$

ein Gehalt des Trockenknorpels an Chondroitinschwefelsäure von **42.12**%.

— — — —

Die 4 voneinander völlig unabhängig aufgefundenen Werte für den Chondroitinschwefelsäuregehalt des Knorpels ergeben folgendes Bild:

| | | |
|---|---|---|
| 1. Abspaltbarer S | 37.39% | Chondroitinschwefelsäure, |
| 2. Reduktion | 41.40% | Chondroitinschwefelsäure, |
| 3. Essigsäure | 42.12% | Chondroitinschwefelsäure, |
| 4. Stickstoff | 44.12% | Chondroitinschwefelsäure, |
| Mittelwert: | **41.23**% | Chondroitinschwefelsäure. |

Wir halten uns um so mehr für berechtigt, den richtigsten Wert in der Mitte zu suchen, als erstens der erste Wert wegen des erheblich höheren Gesamtschwefelgehaltes eher zu niedrig scheint und zweitens der vierte Wert durch kleine Versuchsfehler leicht zu hoch werden kann, indem Spaltprodukte des Glutins der Phosphorwolframsäurefällung entgehen könnten.

---

10) Siehe S. 27.

## C. Die Zusammensetzung des Knorpels.

Auf Grund vorliegender Bestimmungen machen wir uns von der Zusammensetzung des Knorpels etwa folgendes Bild:

| | |
|---|---|
| 1. Glutin | 42.00% |
| 2. Chondroitinschwefelsäure | 41.23% |
| 3. Asche | 9.76% |
| 4. Unbekannte Bestandteile | 7.01% |
| | 100.00%. |

Es ist nun interessant, festzustellen, daß die Menge Substanz, die bei der Herstellung der Chondrinlösung (siehe S. 25) ungelöst blieb, auch 7% des Trockenknorpels ausmacht, also ebensoviel, wie die Menge „unbekannter Bestandteile". Wir vermuten, daß diese Substanz, außer aus in Wasser unlöslichen Zellbestandteilen, aus dem von Mörner[11]) aufgefundenen Albumoid besteht, was auch mit Sadikoffs Ansichten übereinstimmt.[12])

---

## Zusammenfassung.

1. Sowohl unsere eigenen Untersuchungen als auch die kritische Betrachtung der vorliegenden Literatur führte zu einer Bestätigung der Leveneschen Feststellungen bezüglich der Zusammensetzungen der Chondroitinschwefelsäure aus 2 Mol. Glukuronsäure. Das Zusammentreten dieser Bestandteile unter Austritt der erforderlichen Menge Wassers führt zur Leveneschen Formel.

2. Die neuerdings von Sawjalow geäußerte Annahme, das Chondrosin bestehe aus Lutidinkarbonsäure und Chitose ist abzulehnen. Chitose kann sekundär aus Glukosamin, eine kleine Menge von Pyridinbasen bei der trockenen Destillation aus Leim ebenso entstehen.

3. Die vorliegenden Untersuchungen bezweckten eine quantitative Bestimmung der Zusammensetzung des reinen Nasenknorpels vom Schwein. Als charakteristische rein chemische Bestandteile ergab sich nur Glutin einerseits und Chondroitinschwefelsäure anderseits. Daneben fand sich Asche und eine geringe Menge einer bei der Bereitung der Knorpelleimlösung ungelöst bleibenden Substanz (Albumoid?).

4. Die Menge Leim wurde ermittelt einerseits aus der Gesamtmenge des durch Phosphorwolframsäure aus Knorpelleim-

---

[11]) l. c.
[12]) l. c.

lösung fällbaren Stickstoffanteiles, anderseits aus der Menge nach vollzogener saurer Totalhydrolyse durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff. Es ergab sich im Mittel ein Gehalt von 42% Glutin.

5. Der Gehalt an Chonroitinschwefelsäure wurde in vierfacher Art ermittelt:

a) Aus der Menge Schwefelsäure, welche durch saure Hydrolyse aus der Chondroitinschwefelsäure abgespalten werden konnte.

b) Durch Feststellen des Reduktionsvermögens nach Säurehydrolyse. Das Reduktionsvermögen wurde kontrolliert durch Ermittlung jener Glukosaminmenge, welche nach dem neuen Verfahren von Zuckerkandl-Messiner direkt kolorimetrisch bestimmt werden kann. Es ergab sich dabei auch, daß das Glukosamin der Chondroitinschwefelsäure zweifellos azetyliert ist, daß also die gegenteilige Ansicht Schmiedebergs nicht zu Recht besteht.

c) Aus der Menge der durch Hydrolyse abspaltbaren Essigsäure.

d) Aus der Menge des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Chondroitinstickstoffs.

6. Auf Grund unserer Analysen gelangen wir zu folgender Vorstellung über die Zusammensetzung des Knorpels:

| | |
|---|---|
| Glutin . . . . . | 42% |
| Chondroitinschwefelsäure . . . . | 41% |
| Asche . . . . . | 10% |
| Wasserunlöslicher Rest . . . . . | 7% |
| Summe . . . | 100%. |

## Lebenslauf.

Ich wurde am 29. Oktober 1906 als Sohn von Otto Winter, Fabrikdirektor in Richterswil, geboren.

Nach 5½ Jahren Primarschule in Richterswil besuchte ich die Gymnasialabteilung der Kantonsschule Trogen, wo ich im Frühjahr 1925 die Maturitätsprüfung ablegte. Im Herbst 1925 trat ich in die E. T. H., vierte Abteilung, ein, die ich im Sommer 1929, nach bestandener Diplomprüfung, verließ.

Während und nach meinem Studium an der E. T. H. hatte ich mehrmals militärische Kurse und Uebungen zu besuchen; am. 1. Januar 1930 wurde ich zum Lieutenant der Infanterie befördert.

Von November 1929 an arbeitete ich im Institut für medizinische Chemie der Universität Wien, wo auch unter Leitung des Vorstandes, Prof. Dr. O. v. Fürth, vorliegende Arbeit entstand.

Walter Winter.