

# Die Kohlehydratgruppe des krystallisirten Ovalbumins.

Von

Dr. **Leo Langstein** aus Wien.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 38.)

(Der Redaction zugegangen am 6. September 1900.)

---

## I.

Unsere Kenntnisse von den Atomgruppen, die sich an dem Aufbau der verschiedenen Eiweisskörper betheiligen, sind zum grössten Theil das Resultat von Untersuchungen, die an von der Natur in reichlicher Menge dargebotenen, jedoch nicht die Gewähr der Einheitlichkeit bietenden Rohstoffen angestellt wurden. Und doch ist gerade die absolute Reinheit des Ausgangsmaterials eine unerlässliche Voraussetzung, sobald es sich darum handelt, aus den Produkten, die wir bei der Spaltung bestimmter Stoffe erhalten, sichere Schlüsse auf deren chemischen Aufbau zu ziehen. In diesem Sinne wird es gewiss einen Fortschritt in der Eiweisschemie bedeuten, wenn die bisher vorliegenden Untersuchungen an nachweislich reinen Eiweisssubstanzen wiederholt werden, wie wir solche derzeit in den krystallisirten pflanzlichen Globulinen, im krystallisirten Ovalbumin und Serumalbumin besitzen.

Auch die Frage nach der Kohlehydratgruppe des Ovalbumins hat deswegen eine befriedigende Lösung noch nicht gefunden, weil die Thatsache, dass das bei den betreffenden Untersuchungen verwendete Ausgangsmaterial kein einheitliches war, die Sicherheit der gefundenen Resultate beeinträchtigte. Abgesehen von der Fehlerquelle, die das dem Ovalbumin anhaftende und schwer zu beseitigende Ovomuroid

mit sich bringt, ist das Eiweiss, welches bei derartigen Untersuchungen das Ausgangsmaterial bildete, ein Gemenge mehrerer Eiweisskörper, wenn auch darin das Ovalbumin beträchtlich überwiegt.<sup>1)</sup>

Ich kann hier von einer ausführlichen Besprechung der ganzen bisher vorliegenden Litteratur über die von Pavy<sup>2)</sup> neu angeregte Frage nach der Kohlehydratgruppe der Eiweisskörper umsomehr absehen, als sie vor Kurzem durch Blumenthal<sup>3)</sup> übersichtlich zusammengestellt worden ist. Ich möchte nur die neueren Angaben herausgreifen, die speciell auf die Kohlehydratgruppe des Ovalbumins Bezug haben.

C. Th. Mörner,<sup>4)</sup> welcher in dem Ovomuroid des Eierklars eine reiche Quelle reducirender und osazongebender Substanz gefunden hat, gelang es nicht, aus dem Ovalbumin Zucker abzuspalten.

Ebenso fand Spenzer,<sup>5)</sup> dass gewöhnliches, nicht weiter gereinigtes Hühnereiweiss ein Osazon liefert, wenn das Verfahren von Pavy zur Auffindung von Zucker unter den Spaltungsprodukten der Proteinstoffe angewendet wird, nicht aber das gereinigte.

Diesen negativen Ergebnissen stehen zahlreiche positive gegenüber.

Krawkow<sup>6)</sup> gelang es, aus coagulirtem und durch langdauerndes Waschen mit Wasser gereinigtem Ovalbumin nach Spaltung mit verdünnten Säuren ein Osazon zu erhalten, das er als Glukosazon anspricht.

Blumenthal<sup>7)</sup> erhielt aus durch Siedehitze coagulirtem Ovalbumin, das er nach dem Auswaschen mit Kalilauge wieder in Lösung gebracht und durch Essigsäure gefällt hatte, ein

---

1) Vgl. Schütz, diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 3.

2) Pavy, *Physiol. of the Carbohydrates*, London 1894.

3) Blumenthal, *Deutsche medicin. Wochenschrift*. 1899, S. 49—50.

4) C. Th. Mörner, *Centralbl. f. Physiol.* 1893, Bd. VII.

*Skandin. Archiv*, Bd. VI, S. 332.

5) Spenzer, *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XXIV, S. 354.

6) Krawkow, *Pflügers Archiv*, Bd. LXV, 1897.

7) Blumenthal, *Charité-Annalen*, 1898.

Osazon, das deutliche Drehung zeigte. Es konnte ebensowohl Galaktosazon als auch Glukosazon sein.

Eichholz<sup>1)</sup> erhielt aus Ovalbumin, das er aus sehr verdünnter Lösung coagulirt und tagelang gewaschen hatte, das Osazon der Glykose.

Seemann,<sup>2)</sup> dem es gelang, aus dem Mucoïd des Hühnereies ein Kohlehydrat abzuspalten, das er mit Glykosamin identificiren konnte, glaubt das gleiche Kohlehydrat auch aus Ovalbumin durch Spaltung erhalten zu haben; er lässt diesen Punkt jedoch unentschieden, weil er die Möglichkeit nicht auszuschliessen vermag, dass das Glykosamin von dem dem Ovalbumin noch anhaftenden Mucoïd herrührt.

Ganz allein steht die Angabe von Weiss,<sup>3)</sup> der aus nach Pavy's Methode verarbeiteten Ovalbumin das Osazon der Methylpentose wie den Zucker selbst erhielt.

Hofmeister<sup>4)</sup> fand, dass das krystallisirte Eialbumin ein kohlehydratreicher Eiweisskörper ist, der beim Kochen mit verdünnten Säuren einen Theil seines Kohlehydrates abspaltet. Er schätzt aus der Menge des erhaltenen Osazons den gesammten Kohlehydratgehalt auf ca. 15<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Ueber die Natur des Kohlehydratcomplexes spricht sich Hofmeister nicht weiter aus.

Fassen wir vorliegende Angaben zusammen, so sehen wir, dass eine Einigung in der Frage nach dem Kohlehydratcomplex des Ovalbumins nichts weniger als erreicht ist.<sup>5)</sup>

---

1) Eichholz, Journal of Physiol., Bd. XXIII.

2) Seemann, Inaugur.-Dissert., Marburg 1898.

3) O. Weiss, Centralbl. f. Physiol., 1898.

4) F. Hofmeister, Ueber jodirtes Eialbum., Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV.

5) Bemerkenswerth in dieser Richtung ist die Art, wie Pflüger<sup>1)</sup> die vorliegenden Thatsachen zusammenfasst.

Er bemerkt hinsichtlich der Beziehungen des Ovalbumins zu den Glykoproteinen: «Diejenige Gruppe der Glykoproteine, zu denen das Ovalbumin gehört, gilt nicht für sicher, einmal wegen unreinen Ausgangsmaterials und dann, weil das Ovalbumin aus glykosid- (ovomukoid-) haltiger Lösung auskrystallisirt worden ist, weil so zuverlässige Chemiker,

---

1) Organ. Chemie, Richter, 1900.

Einerseits wird die Thatsache, dass sich ein solcher aus dem Ovalbumin abspalten lasse, überhaupt gelegnet, andererseits herrscht bei denjenigen Autoren, denen eine solche Abspaltung gelang, keine Uebereinstimmung in der Charakterisirung des abgespaltenen Complexes.

Bei meiner Untersuchung, die eine endgiltige Klärung dieser Frage bezwecken sollte, bin ich von nach Hopkins und Pinkus<sup>1)</sup> krystallisirtem Ovalbumin ausgegangen. Durch die Eigenschaft des Ovomuroids, aus mit Ammonsulfat halbgewässiger Lösung bei Säurezusatz nicht auszufallen, ist bei wiederholtem Umkrystallisiren des Ovalbumins eine Verunreinigung damit ausgeschlossen, wie denn andererseits dieses Verhalten des Ovomuroids die reichliche Ausbeute von krystallisirtem Eiereiweiss bei der Darstellung nach dem von Hopkins und Pinkus angegebenen Verfahren erklären dürfte.

## II. Darstellung der Kohlehydratgruppe aus krystallisirtem Ovalbumin.

Die Menge des von mir verwendeten krystallisirten Ovalbumins betrug ungefähr 100 g (aus 4 l. Eierklar). Dasselbe wurde durch dreimaliges Umkrystallisiren von allen amorphen Beimengungen befreit, durch Alkohol coagulirt, sorgfältig ausgewaschen und nach Trocknung bei 110° staubfein gepulvert.

Bei der Abspaltung der Kohlehydratgruppe hielt ich mich im Wesentlichen an das von Seemann<sup>2)</sup> angegebene Verfahren.

Für Vorversuche wurden je 5 g krystallisirtes Ovalbumin nach vorhergehender Quellung in Alkali mit 100 ccm. 3%iger Salzsäure im mit Rückflusskühler versehenen Kölbchen durch mehrere Stunden auf dem Sandbad erhitzt. Nach je einer Stunde wurden der Flüssigkeit 10 ccm. entnommen und der

---

wie Mörner und Spenser, aus gereinigtem Ovalbumin kein Kohlehydrat erhalten konnten, und weil die Glykoproteine durch procentische Zusammensetzung und sonstige Reactionen mit kohlehydratfreien Eiweissstoffen vollständig übereinstimmen.»

1) Hopkins und Pinkus, Journal of Physiol., Bd. XXIII, S. 130 und Bd. XXV, S. 306.

2) Seemann, Inaugur.-Dissert., Marburg 1898.

Kohlehydratgehalt in diesen mittelst Fehling'scher Lösung bestimmt.

Die maximale Ausbeute an Kohlehydrat erhielt ich nach vierstündigem Erhitzen. Der Kohlehydratgehalt der Flüssigkeit, auf Dextrose gerechnet, betrug dann 7<sup>0</sup>/<sub>10</sub>. Wurde der zurückbleibende Eiweisschlamm einer nochmaligen einstündigen Säurewirkung unterworfen, konnten noch 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub><sup>0</sup>/<sub>10</sub> Kohlehydrat abgespalten werden. Der gut ausgewaschene Rückstand gab jedoch noch starke Kohlehydratreaction, ohne dass durch fortgesetztes Erhitzen mit verdünnter Säure eine weitere Abspaltung gelang.

Von wesentlichem Einfluss auf eine möglichst ergiebige Kohlehydratabspaltung erwies sich, wie schon Seemann bemerkte, die der Säurewirkung vorhergehende Quellung in Alkali. Meine besten Resultate erhielt ich durch eine so energische Quellung, dass das Ovalbumin zu einer Gallerte gestand.

Zur Charakterisirung des abspaltbaren Kohlehydrates wurde die Hauptmasse des Ovalbumins in Portionen von je 25 g nach vorhergehender Quellung in Kalilauge mit <sup>1</sup>/<sub>2</sub> Liter 3<sup>0</sup>/<sub>10</sub>iger Salzsäure im mit Rückflusskühler versehenen Kolben auf dem Sandbade 4—5 Stunden lang im Sieden erhalten. Dabei nahm die Flüssigkeit einen leicht gelblichen Farbenton an.

Vom ungelösten Rückstand wurde abfiltrirt und das neutralisirte Filtrat, ohne dass vorher die in Lösung befindlichen Eiweisskörper entfernt worden wären, nach Baumann<sup>1)</sup> benzoylirt.

Dabei trat nur mässige Erwärmung, auch keine Rothfärbung ein, wie sie Seemann bei seinen Benzoylirungsversuchen bemerkte. Nach Neutralisation der Benzoylirungsflüssigkeit wurde das reichlich ausgeschiedene Benzoylprodukt absitzen gelassen und durch Absaugen von der Flüssigkeit getrennt. Es wurde mit verdünntem Ammoniak und Wasser gewaschen und stellte danach eine gelblichweisse spröde Masse dar. Dieselbe wurde getrocknet, in heissem absoluten Alkohol

---

1) Baumann, Ber. XIX, S. 3218.

digerirt, wobei sie sich fast vollständig in diesem löste. Von dem spärlichen ungelösten Rückstand wurde abfiltrirt und die heisse gelbgefärbte alkoholische Lösung auf dem Wasserbad allmählich erkalten gelassen. Dabei fiel in den ersten Stunden ein weisser amorpher Niederschlag aus, der abfiltrirt und nach Waschen mit heissem absoluten Alkohol getrennt untersucht wurde.

Er war in den meisten Lösungsmitteln unlöslich, mit Ausnahme von Eisessig, in dem er sofort zerfloss. Krystallisirt konnte ich ihn nicht erhalten. Er gab keine Biuretreaction, mit Alkali und Bleiacetat im Wasserbad erhitzt spaltete er reichlich Schwefel ab. Ich versuchte nun diesen Körper, der also den Benzoyl ester eines an locker gebundenem Schwefel sehr reichen Spaltungsproduktes des krystallisirten Ovalbumins darstellt, mit concentrirter Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr zu spalten. Nach mehrstündigem Erhitzen bei  $100^{\circ}$  wurde erkalten gelassen, die ausgeschiedene Benzoesäure abfiltrirt, die rothbraun gefärbte Lösung mit Aether ausgeschüttelt und im Vacuum über Kalistücken eingengt. Aus dem zurückbleibenden schwarzbraunen Syrup krystallisirten spärliche kleine Nadeln. Eine in Wasser gelöste Probe dieses Syrups enthielt reichlich abspaltbaren Schwefel; eine andere gab mit Nitroprussidkalium eine moosgrüne, sofort verschwindende Farbenreaction; die Cysteinreaction mit Eisenchlorid fiel negativ aus. Zu einer Analyse reichte mein Material nicht.

Die nach Abfiltriren des eben besprochenen Körpers erhaltene klare alkoholische Lösung trübte sich nach ca. 12 Stunden neuerdings, und es fielen makroskopisch gut wahrnehmbare seidenglänzende Nadeln aus, die stellenweise federbuschartig angeordnet waren, untermischt mit spärlichen amorphen Krümeln. Nach ungefähr drei Tagen war die Abscheidung der Krystalle beendet. Sie wurden durch Absaugen von der Mutterlauge befreit. Die Trennung derselben von dem mitausgefallenen amorphen Niederschlag gelang nur schwer. Durch tagelange Extraction mit kaltem absoluten Alkohol, in dem sich die Nadeln, obgleich schwer, lösten, nicht aber der amorphe Körper, kam ich, wenn auch unter Verlusten, zum Ziel. Die alkoholische Lösung der Krystalle wurde an der Luft verdunsten gelassen, wobei sich ca.  $\frac{1}{2}$  cm. lange weisse seidenglänzende Nadeln ausschieden.

Der Schmelzpunkt derselben ergab sich zu  $202-203^{\circ}$ .

Der Stickstoffgehalt, an einer kleinen Menge Substanz (0,0312 g) nach Kjeldahl bestimmt, betrug 1,962<sup>o</sup>/<sub>o</sub>. Dieses Verhalten erlaubt den Schluss, dass Pentabenzoylglykosamin vorliegt. Für dasselbe fand Pum<sup>1)</sup> nach wiederholtem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol einen Schmelzpunkt von 203<sup>o</sup> und einen Stickstoffgehalt von 2,00<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Ich versuchte nun, dem Verfahren von Seemann folgend, aus den Mutterlaugen den Zucker selbst abzuspalten. Die alkoholische Mutterlauge wurde in grosse Mengen destillirten Wassers gegossen, wobei sich das Benzoylprodukt zuerst in weissen Flocken absetzte, jedoch bald körnig wurde. Es wurde abfiltrirt, mit heissem Wasser gewaschen und im zugeschmolzenen Rohr mit Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,1 durch 24 Stunden auf 100<sup>o</sup> erhitzt. Nach dem Erkalten wurde von der in der gelbgefärbten Salzsäure massenhaft ausgeschiedenen Benzoessäure abfiltrirt, und die Salzsäure, nachdem sie mit Aether energisch ausgeschüttelt worden war, bei ca. 60<sup>o</sup> abgeraucht. Aus dem zurückbleibenden braunen Syrup krystallisirte neben geringen Mengen Kochsalz und langen Nadeln (Gyps?) ein Körper, Anfangs in Sphenoiden, später in rhombischen Platten. Der braune Syrup wurde in absolutem Alkohol gelöst und von den ungelösten Krystallen abfiltrirt. Diese wurden aus salzsäurehaltigem Wasser umkrystallisirt, wobei sie mehrere Millimeter im Durchmesser erreichten.

Dieselben boten jedoch, wie eine von Herrn Prof. Bruhns am hiesigen mineralogischen Institut vorgenommene Untersuchung lehrte, nicht die aus Ledderhose's<sup>2)</sup> Arbeit über Glykosamin bekannten charakteristischen Formen dar, zeigten vorwiegend Zwillingsformen und, soweit dies untersucht werden konnte, ein abweichendes optisches Verhalten.

War somit auf diesem Wege eine Identification meiner Krystalle mit salzsaurem Glykosamin nicht möglich, so gelang sie doch auf dem Wege der Analyse:

---

1) Pum, Ueber d. Benzoessäureester des Glykosamins, Monatshefte f. Chemie, Bd. XII.

2) Ledderhose, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 142.

	Gefunden	Berechnet
0,1166 g Substanz enthielten	33,51 % C 6,53 % H	33,34 % C
0,113 g Substanz enthielten		6,49 % H
	6,38 % N	6,49 % N

Es kann demnach an der Identität der gefundenen Krystalle mit salzsaurem Glykosamin kein Zweifel bestehen.

Aus dem abweichenden krystallographischen Verhalten weitere Schlüsse zu ziehen, etwa auf ein stereoisomeres Glykosamin, wäre verfrüht; für eine Untersuchung des optischen Verhaltens der Krystalle reichte mein Material nicht.

Aus meiner Untersuchung geht demnach unzweifelhaft hervor, dass das Glykosamin am Aufbau des krystallisirten Ovalbumins theilhaftig ist.

Die Frage, ob es den einzigen Kohlehydratcomplex darin darstellt, ist damit freilich nicht entschieden. Da jedoch andere benzoylirte Kohlehydrate nicht aufzufinden sind, so scheint mir diese Auffassung zur Zeit die am meisten berechnigte. Berechnet man auf Grund des für das gespaltene Eiweiss gefundenen Reductionsvermögens den vermeintlichen Gehalt an Glykosamin, so ergibt sich etwa 10—11 %<sup>1)</sup> wobei noch zu berücksichtigen ist, dass eine ganz befriedigende Abspaltung des Glykosamins durch Säure nicht zu erzielen ist.

In dieser Richtung ist bemerkenswerth, dass es mir weder durch Spaltung von krystallisirtem Ovalbumin mit concentrirter Salzsäure, noch mit concentrirter Salzsäure und Zinnchlorür (30 g Zinnchlorür auf 50 ccm. Salzsäure) gelang, aus dem Eiweiss Kohlehydrat zu erhalten. Bei Spaltung mit concentrirter Salzsäure trat reichliche Melaninbildung auf, bei Anwesenheit von Zinnchlorür blieb die Flüssigkeit klar (sie zeigte nur einen röthlichen Farbenton), gab jedoch hinterher nicht die Spur einer Molisch'schen Reaction.

1) Nach Ledderhose<sup>1)</sup> sind zur Reduction von 1 ccm. Fehling'scher Lösung 5,986 mg salzsaures Glykosamin erforderlich; nach meiner Berechnung 6,003 mg.

<sup>1)</sup> Ledderhose, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 146.



Um für dieses Verhalten eine Erklärung zu finden, wurden folgende Versuche angestellt:

I. Erhitzen von salzsaurem Glykosamin mit concentrirter Salzsäure mehrere Stunden lang auf dem Sandbade.

II. Mehrstündiges Erhitzen von salzsaurem Glykosamin mit concentrirter Salzsäure unter Zusatz von Zinnchlorür.

III. Mehrstündiges Erhitzen von salzsaurem Glykosamin unter Zusatz von Chlorammonium.

Im ersten Versuch bräunte sich die Lösung, doch blieb das Glykosamin sicher zum grössten Theil unverändert.

Im zweiten Versuch blieb die Salzsäure farblos und das Glykosamin unverändert.

Im dritten Versuch färbte sich die Salzsäure bald dunkel-schwarz unter reichlicher körniger Abscheidung eines schwarz gefärbten Produktes.

Nach diesem Ergebniss ist für die negativen Resultate der Versuche, aus Ovalbumin durch concentrirte Säure Kohlehydrat abzuspalten, die Erklärung dadurch gegeben, dass es das durch starke Säure aus dem Eiweiss abgespaltene Ammoniak ist, welches die Reaction in einem anderen Sinne verlaufen lässt, bei Einwirkung von concentrirter Säure allein unter Bildung schwarzgefärbter, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Zinnchlorür unter Bildung farbloser Produkte.

Meine Untersuchung über die Kohlehydratgruppe der Eiweisskörper gedenke ich auf das krystallisirte Serumalbumin auszudehnen und werde seinerzeit darüber berichten.

