

Eine einfache Methode zur Darstellung von salzsaurem Glukosamin aus Ovomukoid, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis des Ovomukoids.

Von
Adolf Oswald.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Eidgenössischen Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 31. Juli 1910.)

Zur Identifizierung von Glukosamin in Gemischen von Eiweißspaltprodukten besitzen wir zurzeit drei Verfahren: die Benzoylierung nach Schotten-Baumann (mit nachfolgender Trennung der Benzoate nach Fr. Müller¹⁾), die Darstellung der Phenylisocyanatverbindung nach Steudel²⁾ und die Oxidation zu Norisozuckersäure nach Neuberg-Wolff.³⁾ Das erste Verfahren gestattet durch Verseifung der Benzoate zu Glukosamin als solchem zu gelangen, die Regeneration desselben aus der Phenylisocyanatverbindung resp. deren Anhydrid, einem α -Tetraoxybutyl- γ -phenyl- μ -hydroxyimidazol, ist bisher nicht durchgeführt worden, das dritte Verfahren schließt einen direkten Nachweis aus. Das erste und dritte Verfahren haben den Nachteil, daß sie recht schlechte Ausbeuten geben. Seemann⁴⁾ erhielt aus 34 g Ovomukoid bloß 0,5 g krystallisiertes Benzoat und aus den verseiften Mutterlaugen 0,8 g krystalli-

¹⁾ Fr. Müller, Beiträge zur Kenntnis des Mucins und einiger damit verbundener Eiweißstoffe, Zeitschrift f. Biol., Bd. XLII, S. 468 (1901).

²⁾ H. Steudel, Eine neue Methode zum Nachweis von Glukosamin und ihre Anwendung auf die Spaltungsprodukte der Mucine, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 353 (1901).

³⁾ C. Neuberg und H. Wolff, Über den Nachweis von Chitosamin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 3840 (1901).

⁴⁾ J. Seemann, Über die reduzierenden Substanzen, welche sich aus Hühnereiweiß abspalten lassen, Inaug.-Dissert., Marburg 1898.

sierten Zucker, während nach den Titrationswerten 12 g Zucker im gesamten Ausgangsmaterial enthalten waren.¹⁾ Aus 100 g krystallisiertem Ovalbumin erhielt Langstein²⁾ knapp soviel Benzoate, um eine Stickstoffbestimmung auszuführen und aus den verseiften Mutterlaugen gerade soviel des salzsauren Zuckers, als für eine Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffbestimmung notwendig war. Nach der Titration waren 10–11 g Glukosamin darin enthalten. Neuberg und Heymann³⁾ erhielten bloß 0,3 g Norisozuckersäure aus 20 g Pseudomucin, während nach ihren eigenen titrimetrischen Messungen über 6 g reduzierender Substanz, auf Traubenzucker bezogen, sich daraus abspalten ließen. Mit Hilfe der Phenylisocyanatmethode erhält man kein Reaktionsprodukt in Fällen, wo die anderen Verfahren noch ein positives Resultat liefern. Es soll hierauf später eingegangen werden.

Die Beschäftigung mit einem bisher nicht untersuchten Mucin, von welchem mir nur eine geringe Menge zur Verfügung stand, veranlaßte mich, zu prüfen, ob sich nicht eine Methode ausfindig machen ließe, welche gestattet, in kleinen Quantitäten von Proteinen Glukosamin nachzuweisen. Um das wertvolle Material, um dessentwillen die Bearbeitung dieses Gegenstandes vorgenommen wurde, zu schonen, wandte ich mich vorerst anderen Mucinkörpern zu. Ich wählte zunächst das Ovomukoid, von welchem mir ein Präparat aus der Sammlung des hiesigen Instituts von Prof. Winterstein in entgegenkommender Weise zur Verfügung gestellt wurde.

1 g des Präparates wurde nach dem Vorgehen von Seemann⁴⁾ eine Stunde mit 40 ccm eines Gemisches von 1 Teil

¹⁾ Im Biochemischen Handlexikon ist angegeben, daß aus 100 g Ovomukoid 29,4 g Aminohexose gewonnen sind, mit dem Hinweis auf Seemanns Inaug.-Dissert. Diese Angabe ist unrichtig, ich habe sie im Original vergeblich gesucht, vielmehr bestehen die Angaben zu recht, wie sie hier oben im Text angeführt sind.

²⁾ L. Langstein, Die Kohlenhydratgruppe des krystallisierten Ovalbumins, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 49 (1900).

³⁾ C. Neuberg und F. Heymann, Zur Kenntnis des Pseudomucins, Hofmeisters Beiträge, Bd. II, S. 201 (1902).

⁴⁾ loc. cit.

käuflicher konzentrierter Salzsäure und 9 Teilen Wasser unter Rückflußkühlung auf dem Wasserbade erhitzt. Die von einem dunklen Schlamm abfiltrierte braune Flüssigkeit wurde nach folgendem Prinzip verarbeitet.

Winterstein¹⁾ hatte aus einem durch Spaltung mit konzentrierter Salzsäure erhaltenen Zersetzungsgemische von Pilzcellulose salzsaures Glukosamin dadurch erhalten, daß er die durch Huminsubstanzen schwarz gefärbte Flüssigkeit gegen Wasser dialysierte und das Dialysat einengte. Daraus krystallisierte ohne weiteres der salzsaure Aminozucker. Auf einen Hinweis von Prof. Winterstein auf dieses Verfahren dialysierte ich das Spaltungsgemisch nach vorherigem Einengen auf dem Wasserbade gegen destilliertes Wasser. Es läßt sich das in sehr einfacher Weise durchführen, indem man ein quadratförmig zugeschnittenes Pergamentpapier trichterförmig zusammenfaltet, mit der Lösung beschickt und auf einen mit Wasser gefüllten Filtrierstutzen stellt.

Das 24stündige Dialysat wurde auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingeengt und sich selbst überlassen. Nach dem Abkühlen schieden sich harte Krystalle aus von dem typischen Aussehen des salzsauren Glukosamins. Sie wurden abfiltriert und mit starkem Weingeist, in dem sie sich nicht lösten, farblos gewaschen. Die Ausbeute betrug 0,2 g, also nicht viel weniger, als sich nach den Titrationswerten erwarten ließ (0,3 g). Die Menge reichte aus, um eine Stickstoffprobe (nach Lassaigne) und eine Reduktion nach Fehling anzustellen und den Chlorgehalt zu bestimmen. Alle drei Reaktionen fielen positiv aus, außerdem stimmte, wie erwähnt, die Krystallform für salzsaures Glukosamin. Zuerst waren die von Fr. Müller²⁾ beschriebenen rhomboedrischen Platten erhalten worden, beim Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von Weingeist erhielt ich auch die von Ledderhose³⁾ und Fr. Müller be-

¹⁾ E. Winterstein, Zur Kenntnis der in den Membranen der Pilze enthaltenen Bestandteile (II. Mitteilung), Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 134 (1894).

²⁾ loc. cit.

³⁾ G. Ledderhose, Über Glykosamin, Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 139 (1880).

schriebenen typischen Hexagondodekaeder und zwar beide von letzterem abgebildete Formen.

Die Krystalle schmeckten süß mit bitterem Nachgeschmack und verbrannten auf dem Platinblech unter starker Blähung und ohne Hinterlassung von Asche.

Da die Mutterlauge der Krystalle starke Biuretreaktion zeigte — schön granatrote Färbung — und da hiermit erwiesen war, daß die Gegenwart von Peptonen (und wohl auch Albumosen) das Auskrystallisieren des salzsauren Glukosamins nicht verhinderte, so versuchte ich, das Verfahren dadurch zu vereinfachen, daß ich das Dialysieren wegließ und das Zersetzungsgemisch direkt einengte.

Zu dem Behufe wurden 0,75 g des gleichen Ovomukoidpräparates in gleicher Weise zersetzt. Die vom ungelösten braunen Rückstand abfiltrierte Lösung wurde ohne weiteres auf dem Wasserbade bei gelinder Wärme eingengt. Nach passender Einengung schieden sich schon in der Wärme, mehr noch aber beim Abkühlen wieder die Krystalle aus. Die Rohausbeute, welche ein ziemlich farbloses Präparat darstellte, betrug 0,11 g. Sämtliche oben erwähnten Proben auf salzsaures Glukosamin fielen positiv aus.

Zur weiteren Sicherstellung des Resultates und um genügend Material für quantitative Analysen zu erhalten, nahm ich eine Darstellung aus einem anderen Ovomukoidpräparat vor. Ich ging von 24 Eiern aus und verfuhr nach der Vorschrift von C. Th. Mörner,¹⁾ indem ich die verdünnte Eierklarlösung in der Hitze unter Essigsäurezusatz koagulierte und das von dem Koagulat getrennte Filtrat einengte und mit starkem Alkohol versetzte. Der weiße Niederschlag (6 g) wurde alsdann in oben geschilderter Weise mit 3%iger Salzsäure gespalten und auf Glukosamin verarbeitet. Aus dem Präparat erhielt ich in mehrfachen Fraktionen insgesamt 1,6 g salzsaures Glukosamin (Rohprodukt). Beim einmaligen Umkrystallisieren aus Wasser, dem etwas verdünnte Salzsäure zugesetzt wurde, und Alkohol waren die Krystalle schneeweiß.

¹⁾ C. Th. Mörner, Über eine im Hühnereiweiß in reichlicher Menge vorkommende Mucinsubstanz, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 525 (1893).

Eine Chlorbestimmung ergab 16,49% Cl. Berechnet für $C_6H_{14}O_5NCl$ 16,43%.

0,1056 g Substanz ergaben 0,0711 g AgCl = 0,01752 g Cl.

Eine Stickstoffbestimmung ergab 6,37% N. Berechnet 6,50% N.

0,1961 g Substanz ergaben 0,012496 g N.

Die Krystalle reduzierten Fehlingsche Lösung und zeigten die weiter oben erwähnten Formen.

Um sicher zu sein, daß das Glukosamin dem Ovomukoid entstammte und nicht etwa, was allerdings wenig wahrscheinlich war, von vornherein dem Ovomukoid beigemischt war, indem es im Hühnerei schon vorgebildet vorkäme und von jenem bei der Fällung mitgerissen worden wäre, stellte ich mir ein weiteres Ovomukoidpräparat aus 25 Eiern dar, das ich vor der Spaltung der Dialyse gegen Wasser aussetzte. Beim Einengen der Dialysate auf dem Wasserbade stellte sich heraus, daß sie reduzierende Eigenschaften hatten, und zwar reduzierten sie Fehlingsche Lösung langsam in der Kälte, sogleich aber in der Wärme. Ich konnte ein Osazon darstellen, das bei einmaligem Umkrystallisieren bei 205° schmolz. Aus dem eingengten Filtrate der Ovomukoiddarstellung gewann ich ein Osazon vom Schmelzpunkt 215°. Der aus dem eingengten Dialysat des Ovomukoids resultierende Sirup schied auf Zusatz weniger Tropfen starker Salzsäure beim längeren Stehen keine Glukosaminkrystalle aus. Es dürfte sich somit um bei der Ausfällung des Ovomukoids von diesem mitgerissenen Traubenzucker handeln, von welchem, älteren Angaben zufolge,¹⁾ geringe Mengen im Eierklar vorkommen. Die Menge des dem Ovomukoid anhaftenden Zuckers war überdies nur sehr gering.

Das in Wasser gelöste Ovomukoid wurde nun gegen Wasser so lange dialysiert, als noch reduzierende Substanz in die Dialysate überging. Das danach von dem beigemischten Kohlenhydrat getrennte Ovomukoid wurde alsdann der Spaltung mit verdünnter Salzsäure unterworfen, und ergab bei gleicher Behandlung, wie oben, krystallisiertes salzsaures Glukosamin.

¹⁾ Vgl. Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie, 2. Aufl., S. 531.

Damit war erwiesen, daß das Glukosamin bei der Spaltung aus dem Ovomukoid hervorgegangen war.

Es ergibt sich sonach aus dem Mitgeteilten, daß aus dem durch einstündiges Erwärmen mit ca. 3%iger Salzsäure erhaltenen Spaltungsgemisch des Ovomukoids durch einfaches Einengen auf dem Wasserbade salzsaures Glukosamin in krystallisierter Form sich gewinnen läßt.

Diese Methode hat neben der großen Einfachheit den Vorteil, daß sie gestattet, mit sehr geringen Mengen Ausgangsmaterial auszukommen, da in schon weniger als einem Gramm der Nachweis des Glukosamins gelingt. Sie hat den weiteren Vorteil, daß sie die übrigen Eiweißspaltprodukte unberührt läßt und ihre Untersuchung ohne weiteres gestattet.

Es interessierte mich in der Tat, zu erfahren, welche anderen Produkte der Eiweißspaltung neben dem Aminozucker zugegen waren. Diese Frage ist nicht ohne Bedeutung für unsere Auffassung von der Natur der Mucine.

Zu diesem Zwecke wurden die Mutterlaugen der verschiedenen Darstellungen vereinigt, mit Wasser verdünnt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der gut ausgewaschene Niederschlag sowie das Filtrat wurden in der üblichen Weise mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit. Das Filtrat hinterließ beim Eindunsten auf dem Wasserbade nur eine ganz geringe Menge eines hellgelben Sirups, und da dieser auf Phosphorwolframsäurezusatz noch eine Fällung gab, wurde er abermals mit dem Reagens versetzt. Der alsdann von phosphorwolframsäurefällbaren Bestandteilen freie Sirup, dessen Menge nur äußerst gering war, gab keine Millonsche Reaktion und ließ nach wochenlangem Stehen weder Tyrosin- noch Leucinkristalle ausfallen. Auf andere Aminosäuren wurde der geringen Menge wegen nicht untersucht. Der Sirup gab eine außerordentlich starke Molischsche Reaktion und eine minimale Biuretreaktion.

Der phosphorwolframsäurefällbare Anteil gab sehr starke Biuretreaktion und zwar eine purpurrote, wie sie bei Gegenwart von Peptonen ausfällt. Mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, gab die neutralisierte Lösung eine Fällung. Die stärkste

Fällung trat ein bei Ganzsättigung, schwächer war sie bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung und noch schwächer bei $\frac{1}{2}$ -Sättigung. Es waren somit Proto- und Deuteroalbumosen sowie Peptone zugegen. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß ein Teil des Eiweißes als unlöslicher Körper von vornherein zurückblieb. Es resultiert hieraus, daß außer dem Glukosamin nur höhere Spaltprodukte des Eiweißes vorhanden waren, d. h. es wird das Glukosamin schon abgetrennt, während die übrigen Aminokörper noch in höherem Verbande bleiben. Das Glukosamin scheint sonach in lockerer Bindung im Molekül enthalten zu sein als die übrigen Aminokörper. Diese Tatsache dürfte nicht ungeeignet sein, die alte Auffassung von der glukosidischen Natur der Mucine, die in neuerer Zeit von mancher Seite verlassen wird, zu stützen. Bevor diese Frage weiter diskutiert werden kann, müssen selbstverständlich auch andere Mucine untersucht werden.

Zu erwähnen ist noch, daß die Albumosen und Peptone keine Molisch-Udranszkysche Reaktion gaben, somit sämtliches Glukosamin abgespalten worden war.

Die Gewinnung von salzsaurem Glukosamin nach dem hier geschilderten Verfahren ist mir auch aus anderen Mucinen geglückt. Hierüber soll in einer anderen Mitteilung die Rede sein.

Zum Schlusse sei mir gestattet, auf einen Punkt einzugehen. Steudel¹⁾ hat mit Hilfe seines Phenylisocyanatverfahrens aus dem durch Kochen mit 3%iger Salzsäure erhaltenen Spaltungsgemisch des Ovomukoids keine Phenylureidoglukose bekommen, und da auf Zusatz von Glukosamin zu dem Spaltungsgemisch ein solches Derivat bzw. sein Anhydrid, das α -Tetraoxybutyl- γ -phenyl- μ -hydroxyimidazol, leicht zu gewinnen war, schloß er daraus, daß bei der erwähnten Spaltungsart kein Glukosamin aus dem Ovomukoid entsteht. Da nun aber bei Zerlegung des Mukoids mit konzentrierter Salzsäure das gesuchte Produkt sich finden ließ, nimmt er an, daß bei der Spaltung mit verdünnter Säure zunächst eine polymere Form des Glukosamins abgespalten werde, welche dann bei weiterer Hydrolyse in Glukosamin zerfalle. Meine oben geschilderten Erfahrungen sprechen nicht in diesem Sinne, sondern deuten

¹⁾ loc. cit.

darauf hin, daß schon die Spaltung mit verdünnter Säure den Aminozyucker als solchen loslöst.

Gegen diese Schlußfolgerung läßt sich jedoch ein Einwand erheben. Es könnte in der Tat durch das lange Einengen der verdünnten salzsauren Lösung auf dem Wasserbad, wobei die Konzentration an Salzsäure allmählich zunimmt und schließlich ziemlich erheblich wird, doch eine Spaltung eines ursprünglich polymeren Produktes im Sinne Steudels stattfinden. Gegen eine solche Annahme sprechen allerdings die Dialysierversuche mit dem nur wenig oder gar nicht eingengten Spaltgemische, welche dargetan haben, daß die Dialysate ohne weiteres reduzierten. Um jedoch diesem Einwand voll zu entgehen, machte ich folgenden Versuch. Ich spaltete 4 g Ovomukoid mit 3%iger Salzsäure in gleicher Weise wie früher und versetzte danach die abgekühlte Lösung so lange mit Bleicarbonat in Substanz, bis sich keine Kohlensäure mehr entwickelte. Von dem Bleichlorid filtrierte ich ab, fällte aus dem Filtrat das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff und engte die so erhaltene hellgelbe, nur schwach sauer reagierende Lösung auf dem Wasserbad bei gelinder Wärme bis zum dünnflüssigen Sirup ein. Alsdann ließ ich abkühlen, setzte 2 Tropfen konzentrierte Salzsäure hinzu und ließ bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure stehen. Nach einigen Stunden schieden sich Glukosaminkristalle aus. Somit war erwiesen, daß Glukosamin als solches und nicht ein polymeres Produkt desselben bei der Spaltung mit verdünnter Säure aus dem Ovomukoid abgespalten wird.