

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

Ueber die Kohlehydratgruppe im Eiweissmolekül.

Von

Dr. **N. Krawkow** aus St. Petersburg.

Kaum kann man heutzutage noch zweifeln, dass die Kohlehydrate sich aus den Eiweissstoffen im Organismus bilden können. Es ist bekannt, dass hungernde Thiere, bei denen der Gehalt an Kohlehydraten (resp. Glycogen und Zucker) in der Leber und den anderen Organen bis auf Null heruntergeht, im Stande sind, bei Ernährung mit kohlehydratfreiem Fleisch, Fibrin, Gelatine etc. in den Organen Glycogen neu zu bilden. Fliegenembryonen, die auf kohlehydratfreiem Fleische cultivirt werden, produciren in ihrem Körper Glycogen in bedeutender Menge (Cl. Bernard). Versuche und Beobachtungen in diesem Sinne haben sich schon in Menge angesammelt und sie citiren hiesse das wiederholen, was schon in die elementaren Lehrbücher der Physiologie und physiologischen Chemie aufgenommen ist. Derartige Versuche geben an und für sich natürlich noch nicht das Recht, von der Entstehung der Kohlehydrate direct aus dem Eiweiss, von der Existenz einer präformirten Kohlehydratgruppe im Eiweissmolekül zu sprechen; — nein, diese Versuche weisen nur auf die Möglichkeit der Bildung von Kohlehydraten im Organismus auf Kosten des Nahrungseiweisses und seiner Spaltungsproducte hin. Dabei bilden sich die Kohlehydrate vielleicht synthetisch im Protoplasma aus einfacheren Zersetzungsproducten des Eiweisses. Erinnern wir uns der Resultate der modernen Chemie betreffs der Synthese der Glycosen aus einfachen Verbindungen (z. B. aus Formaldehyd, Akrolein etc.), so erscheint uns diese Vorstellung von dem Vorgang der Bildung der Kohlehydrate im Körper vollkommen möglich.

Eine andere Reihe von Belegen für die Entstehung der Kohlehydrate aus Eiweissstoffen bietet uns der Stoffwechsel bei klinischem und experimentellem Diabetes. Dabei ist gewöhnlich das

Erscheinen des Zuckers im Harn verbunden mit vermehrtem Zerfall von Eiweissstoffen im Körper, welcher in vermehrter Ausscheidung von stickstoffhaltigen Zersetzungsproducten mit dem Harn seinen Ausdruck findet. Dasselbe lässt sich beobachten bei experimentellem Diabetes, und bei Vergiftung mit Phloridzin an hungernden Thieren, bei welchen der nothwendige Gehalt an Kohlehydraten in den Organen und Geweben bis auf ein Minimum reducirt ist. Danach müssen wir mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass beim Diabetes die Eiweissstoffe das Bildungsmaterial für den Zucker sind.

Wenden wir uns für die Lösung der aufgeworfenen Frage zu den Thatsachen der Pflanzenphysiologie, so finden wir auch hier eine ganze Reihe von Beobachtungen, die für die Möglichkeit der Bildung von Kohlehydraten aus Eiweissstoffen sprechen. Asparagin und ähnliche Verbindungen, die innerhalb der Pflanzen sich mit den Kohlehydraten vereinigen, geben damit das Material zum Aufbau der Eiweissstoffe, und umgekehrt können sich unter gewissen physiologischen Bedingungen wieder Kohlehydrate aus Asparagin bilden.

Alle diese Thatsachen der Physiologie und Pathologie stellen uns vor die logische Nothwendigkeit, die Möglichkeit der Entstehung von Kohlehydraten aus Eiweissstoffen anzuerkennen; aber directe chemische Beweise hierfür giebt es bis heute noch sehr wenige. Ich übergebe die Frage nach dem Vorhandensein der Kohlehydratgruppe in einigen Proteïden (z. B. im Mucin nach Landwehr) und in einigen Skeletinen (im Sinne Krukenberg's) z. B. im Chitin, wo dieses auf chemischem Wege bereits bewiesen ist, und wende mich zur Betrachtung derjenigen chemischen Thatsachen, welche auf die Möglichkeit der Abspaltung von Kohlehydraten auch aus wirklichen Eiweissstoffen hinweisen.

Schon Berzelius ¹⁾ machte darauf aufmerksam, dass bei Einwirkung von Salz- oder Salpetersäure auf Zucker ebenso Humin-, Zucker- und Oxalsäure entstehen, wie bei ihrer Einwirkung auf Eiweiss, und dieses weist darauf hin, „dass der Zucker ein Bestandtheil des Proteïns sei.“ Krukenberg ²⁾ machte dieselbe An-

1) Citirt nach Paschutin, „Cursus der allgemeinen und experimentellen Pathologie. 1885. Bd. I. pag. 187. (Russ.) Hier ist sehr sorgfältig die Literatur über Frage nach den Kohlehydraten zusammengestellt.

2) Cit. nach Maly, Jahresbericht 1885. Bd. XV. S. 16.

nahme auf Grund der Beobachtung, dass Eiweisskörper die Fähigkeit haben, Kupferoxyd in alkalischer Lösung bei anhaltendem Kochen zu reduciren. Obgleich unter diesen Bedingungen ein Niederschlag von Kupferoxydul gewöhnlich nicht zu bemerken ist (dank dem Umstand, dass das dabei entstandene Ammoniak und andere Producte kleine Mengen von Kupferoxydul in Lösung erhalten können), so kann man die erfolgte Reduction durch die Reaction mit Ferricyankalium nachweisen, nach vorangegangener Neutralisation der alkalischen Lösung und Ansäuerung mit Salzsäure; dabei bildet sich der für die Oxydul-Salze des Kupfers charakteristische rothbraune Niederschlag. Das ist von Krukenberg für die Eiweissstoffe (und ihre Albumosen und Peptone), für die Proteïde und Albuminoïde bewiesen. So reduciren Serum- und Eialbumin, Serumglobulin, Myosin, Fibrin, Albumose und Pepton aus demselben und aus Caseïn, verschiedene Keratine, Elastoidin, Fibroïn, Spongin — in bedeutender Menge — Kupferoxyd in alkalischer Lösung.

Glutin aus Fischleim besass die Fähigkeit zu reduciren nur in sehr geringem Maasse. Auf Grund der eben besprochenen Eigenschaft der Eiweisse äussert Krukenberg ¹⁾ die Ansicht, dass die Kohlehydratgruppe an der Constitution des Eiweissmoleküls theiligt ist, dass man die Eiweissstoffe gleich den Glycosiden als substituirte Kohlehydrate betrachten kann. „Von der Anwesenheit jener reducirend wirkenden Glycosidgruppen kann man sich an jeder Eiweiss-, Albumose- oder Peptonlösung durch die Trommer'sche Probe leicht überzeugen“, sagt Verf. Natürlich hat diese Ansicht Krukenberg's über den Ban der Eiweisskörper wenig Begründung, da ausser Kohlehydraten eine Menge Stoffe bekannt sind, welche Kupferoxyd in alkalischer Lösung reduciren. Ausserdem fand Drechsel ²⁾ kürzlich, dass die Reduction des Kupferoxyds durch einige Eiweisskörper mit Ausfallen eines Niederschlags von Kupferoxydul auch bei gewöhnlicher Temperatur, aber sehr langsam und allmählich erfolgt. D. untersuchte in dieser Beziehung das Witte'sche Pepton, das Amphopepton und die Deuteroalbumose. Drechsel weist zum Schluss darauf hin, dass aus der Reduction noch nicht auf die Anwesenheit der Kohlehydrat-

1) Ibidem.

2) Drechsel, Zeitschrift für Phys. Chemie. 1895. Bd. XXI. pag. 68.

gruppe im Eiweissmolekül geschlossen werden dürfe, da auch andere Stoffe dies bewirken können, z. B. die Dioxymbenzole, Chloroform etc.

Bei Kossel¹⁾ finden sich Hinweise auf die Anwesenheit der Kohlehydratgruppe in einigen Nucleinen resp. Nucleinsäuren. Aus Hefenuclein erhielt der Autor einen Körper, der durch basisch essigsaures Blei fälschlich ist, Kupferoxyd in alkalischer Lösung reducirt und bei Verbrennung Caramelgeruch giebt. Bei der Untersuchung der Constitution der aus der Thymusdrüse dargestellten Nucleinsäure gelangte Kossel zu Resultaten, die ein neues Licht auf das Verhältniss der Nucleinsäuren zu den Kohlehydraten werfen. Bei der Einwirkung von Schwefelsäure auf diese Säuren im Papin'schen Topf bei 150° C. erhält man unter anderem Ameisensäure und Lävulinsäure. Die Lävulinsäure ihrerseits ist bisher nur als Zersetzungsproduct von Kohlehydraten erhalten worden, sodass Tollens²⁾ die Entstehung der Lävulinsäure als Reaction auf Kohlehydrate (resp. auf Hexose, oder sogen. wahre Glycosen) betrachtet. Auf Grund seiner Entdeckung kommt Kossel zu dem Schluss, dass von Kohlehydraten (Glycogen und Zucker) befreite Organe noch eine bedeutende Menge von Kohlehydratgruppen enthalten können, die in complicirter gebauten Stoffen enthalten sind.

Weiterhin isolirte Hammarsten³⁾ aus dem Pankreas (ebenso aus der Leber und aus der Milchdrüse) ein Nucleoprotein, das durch Kochen mit schwachen Mineralsäuren einen reducirenden Körper giebt. Letzterer ist in Alkohol leicht löslich und fällt aus dieser Lösung auf Zusatz von Aether aus; mit Hefe gährt er nicht, mit Phloroglucin und Salzsäure giebt er eine deutliche Reaction auf Pentosen, bei Destillation mit Salzsäure giebt er Furfurol. Das Osazon dieses Körpers ist in kaltem Wasser schwer, leicht in siedendem Wasser, Alkohol, Aether und Chloroform löslich. Es schmilzt bei 158–160° C. So gleicht dieses Osazon nach allen erwähnten Eigenschaften nur dem Pentaglycosazon. Dem-

1) Kossel, Du Bois-Reymond's Archiv f. Physiol. 1891. Bd. 78. pag. 181.

2) Kossel, *ibid.* 1894. pag. 536.

3) Tollens, Handbuch der Kohlehydrate. 1895. Bd. II. pag. 51.

4) Hammarsten, Zeitschr. f. Physiol. Chemie. 1894. Bd. 18, p. 20.

ungeachtet bemerkt Hammarsten mit der ihm eigenen Vorsicht, dass der Pentosencharakter des von ihm erhaltenen Körpers noch nicht endgültig festgestellt sei, da auch die Glycuronsäure ähnliche Reactionen wie die Pentosen giebt. E. Salkowski¹⁾ bewies zuerst, dass das von Hammarsten erhaltene Kohlehydrat zweifellos eine Pentose ist. Diese Thatsache, in Verbindung mit dem schon früher erfolgten Nachweis von Pentosen im Harn einiger Kranken, durch Salkowski²⁾ und Jastrowitz, ruft eine Reihe von hochinteressanten Fragen nach der Entstehung des Zuckers bei verschiedenen Glycosurien wach, um so mehr, als Erkrankungen des Pankreas, wie bekannt, in der Aetiologie des Diabetes eine wichtige Rolle spielen.

Mörner³⁾ erhielt beim Erwärmen von Globulin aus Pferdeblut mit Wasser daraus einen „gummiähnlichen“ Körper, der nicht reducirte, weder die Biuret- noch die Millon'sche Reaction giebt, aber Stickstoff enthielt; mit Jod gab er keine Farbenreaction, mit Naphthol eine rothviolette Färbung. Durch Erwärmen mit 3—5 % Salzsäure erhält man aus diesem gummiähnlichen Stoff einen reducirenden Körper, der mit Phenylhydrazin ein Osazon bildet. Die Eigenschaften dieses Osazons sind: es fällt aus wässriger Lösung beim Erkalten aus, der Schmelzpunkt liegt bei 170—172° Cels.

Myosin, Vitellin aus dem Hühnerei, Globulin aus der Linse des Kaninchenauges, Serumalbumin, Ovalbumin, Fibrinogen gaben in dieser Beziehung negative Resultate. Aus ausgewaschenem Fibrin erhielt Mörner nach Behandlung mit Säure gleichfalls einen reducirenden Körper, aber nach der Meinung des Autors entsteht er nicht aus dem Fibrin selbst, sondern aus den Blutkörperchen, die durch das Fibrin beim Gerinnungsprocess mechanisch mit niedergerissen werden.

In der letzten Zeit ist über diese Frage eine umfangreiche Arbeit von Pavy⁴⁾ erschienen, deren Hauptresultat darin besteht, dass die Eiweissstoffe als Glycoside betrachtet werden müssen. Aehnlich den Letzteren geben die Eiweisskörper bei Behandlung mit

1) Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1895. Nr. XVII.

2) Salkowski und Jastrowitz, Centralbl. f. d. medicin. Wissenschaft. 1892. Nr. 19 u. 32.

3) Mörner, Centralblatt f. Physiologie. 1894. VII. Nr. 20.

4) Pavy, Die Physiologie der Kohlehydrate 1895.

schwachen Säuren, bei Einwirkung von Wasser bei hoher Temperatur und Druck, ja selbst bei Einwirkung von Fermenten (im gegebenen Falle Pepsin) nach P a v y neben anderen Producten auch Kohlehydrate. So spaltet sich z. B. nach P. das Eiweiss unter Einwirkung von Pepsin in Kohlehydrat und Pepton; das vom Eiweiss abgespaltene Pepton kann sich im Organismus wiederum mit Kohlehydraten zum Aufbau von Eiweiss combiniren. Das Pepton vergleicht Pavy in diesem Falle mit dem Asparagin in den Pflanzen oder mit dem Ammoniumtartrat in Pasteur's Hefeculturflüssigkeit (S. 238). Als Ausgangspunkt für seine Untersuchungen dienten P a v y folgende ältere eigene Beobachtungen: Zieht man verschiedene Organe und Gewebe mit einem Alkali aus und behandelt die so erhaltene Lösung mit Alkohol, so erhält man einen Niederschlag, der beim Kochen mit schwacher Salz- oder Schwefelsäure immer eine mehr oder weniger bemerkbare Menge von reducirenden Stoffen giebt. Die Menge dieses letzteren in den Organen schwankt in Abhängigkeit von der Concentration des gebrauchten Alkalis und von der Dauer der Einwirkung. (Bei energischerer Einwirkung erhielt man immer eine grössere Menge von Stoffen, die Zucker geben.)

Als Hauptbeweis für den Kohlehydratcharakter des von P a v y aus dem Eiweiss erhaltenen Körpers dient die Reaction mit Phenylhydrazin. Hier muss bemerkt werden, dass die chemische Untersuchung Pavy's nur die Kohlehydrate betrifft, die er von dem Eieralbumin erhalten hatte. Seine ganze Beschreibung des Osazons, der Schmelzpunkt desselben etc. beziehen immer nur auf das vom Eieralbumin abgespaltene Kohlehydrat. Aus der Arbeit von Pavy ist es absolut nicht ersichtlich, dass er ebenso wie das Eieralbumin auch andere Stoffe untersucht hätte. Auf das Vorhandensein der Kohlehydratgruppe in den übrigen Eiweissstoffen schliesst Pavy nur aus ihrer Fähigkeit, nach Behandlung mit Säuren Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduciren (pag. 34). Letztere Eigenschaft besitzen Vitellin, Proteïde von Blutserum, Proteïde aus getrockneten weissen Bohnen, Kleber aus Weizenmehl, Fibrin, Mucin, Caseïn. Wir werden unten sehen, inwiefern diese Art des Nachweises für die Kohlehydratgruppe im Eiweiss eine schwache Seite der Arbeit Pavy's bildet.

In Anbetracht der grossen Bedeutung der von P a v y aufgeworfenen Frage über den Glycosidcharacter der Eiweissstoffe für

die Biologie im Allgemeinen und die Pathologie im Speziellen ist es erklärlich, dass ich der Aufforderung von Prof. E. Salkowski, die Angabe von Pavy nachzuprüfen und ev. seine Beobachtungen fortzusetzen, mit grossem Interesse folgte.

Versuche mit Eialbumin.

Obwohl wir das Eialbumin nach dem gewöhnlichen Verfahren durch Kochen einer mit Essigsäure angesäuerten Lösung von Hühnereiweiss darstellten ¹⁾, so kann ich doch nicht umhin, hier einige Einzelheiten der Darstellung des Albumins zu berühren, da sie für die von uns untersuchte Frage nicht geringe Bedeutung haben. Das beim Kochen geronnene Eiweiss wurde abfiltrirt oder colirt, mit Wasser gewaschen, vom Filter oder von der Leinwand in einen Mörser gethan, mit Wasser darin zerrieben und wieder filtrirt; diese Operation wurde so lange wiederholt, bis das durch Eindampfen concentrirte Filtrat keine Reaction mehr auf Zucker (Trommer'sche Probe und mit Phenylhydrazin) und auf Chloride (Probe mit AgNO_3) gab. Zur Vermeidung einer Beimengung von Pflanzenfasern zum Eiweiss, was beim gewöhnlichen Coliren und Abdrücken des Eiweisses durch Leinwand stattfinden kann, wurde letzteres ohne Abdrücken von der Leinwand genommen und in diesem Zustande mit Alkohol und Aether behandelt. Ausserdem nahm ich bei meinen Versuchen Rücksicht auf die Möglichkeit einer Beimischung von Mucoid zum Eialbumin, da, nach meinen Erfahrungen, sich dieser Körper ziemlich schwer vom Eiweiss wegwaschen lässt. Selbst wenn das eingedampfte Filtrat vom Waschwasser keine Reaction auf Chloride mehr giebt, kann man in diesem Filtrat die Anwesenheit von Mucoid (oder ähnlichen Stoffen) nachweisen. Die wässrige Lösung dieses Körpers besitzt alkalische Reaction, opalescirt ein wenig, giebt keine Farbenreaction mit Jod, reducirt nicht Kupferoxyd in alkalischer Lösung; durch Kochen desselben

1) In welcher Weise Pavy das Eierweiss vor der Behandlung mit Schwefelsäure gereinigt hat, geht aus der Angabe hierüber auf S. 46 der deutschen Ausgabe nicht klar hervor, es scheint aber, dass er das getrocknete, gepulverte Hühnereiweiss mit Alkohol und Wasser ausgekocht hat. Dieses Verfahren lässt den Einwand zu, dass möglicherweise der in dem Eiweiss eingeschlossene Zucker dadurch nicht vollständig entfernt ist.

mit schwacher Salzsäure erhält man einen reducirenden Körper. Aus einer wässrigen Lösung lässt er sich ausfällen durch Alkohol im Ueberschuss, Tannin, Phosphorwolframsäure und Bleiessig mit Ammoniak. Zu andern Reagentien verhält er sich ganz ebenso, wie das Mucoid nach Mörner¹⁾. Dank der besagten Schwierigkeit, das Eiweiss von der mukoïden Substanz zu isoliren, muss das Waschen gewöhnlich sehr lange ausgeführt werden, man muss das Eiweiss mehrmals vom Filter entfernen, in der Reibschale mit Wasser zerreiben, wieder filtriren u. s. w.

Kocht man nun so dargestelltes und gereinigtes Eialbumin mit 3—5 %iger Salzsäure, wenn auch nur 2—3 Minuten lang und filtrirt, so überzeugt man sich leicht mit Hülfe der Trommer'schen Probe, dass das Filtrat eine reducirende Substanz enthält. Nach kurzem Kochen des Eiweisses mit der Säure gelingt die Trommer'sche Probe viel besser, als nach langem (z. B. 2—3 Stunden); in letzterem Falle ist ein Niederschlag von Kupferoxydul gewöhnlich nicht zu bemerken, wahrscheinlich in Folge einer reichlichen Bildung von Albumose Peptonen, die das Ausfallen von Kupferoxydul verhindern. Dasselbe lässt sich auch sagen betreffs längerer Behandlung des Albumins mit stärkeren Säuren, z. B. 5—10 % Salz- oder Schwefelsäure. Aber wenn ein Ausfallen von Kupferoxydul auch nicht stattfindet, so kann man sich von dem Vorhandensein von Kupferoxydul doch leicht überzeugen mit Hülfe der Reaction mit Ferricyankalium. Vermittelst der Wismuthprobe und der Probe mit ammoniakalischer Silberlösung kann man sich gleichfalls leicht von der Bildung eines reducirenden Körpers aus dem Eiweiss überzeugen.

Die Reduction von Kupferoxyd beweist natürlich noch nicht die Anwesenheit von Zucker, da noch sehr viele Stoffe bekannt sind, die in ihrer Constitution nichts Gemeinsames mit ihm haben und doch die Fähigkeit, Kupferoxyd zu reduciren, besitzen. Von weit grösserer Bedeutung ist der Versuch, das Osazon durch Einwirkung von Phenylhydrazin darzustellen. Für diese Versuche wurde das Eialbumin 2—3 Stunden lang mit 3—5 %iger Salz- oder Schwefelsäure über offenem Feuer gekocht, darauf wurde die Flüssigkeit abgekühlt und filtrirt; das Filtrat wurde neutralisirt, der entstandene Niederschlag wieder abfiltrirt. Zu diesem Filtrat

1) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chemie. XVIII. pag. 525.

wurde Phenylhydrazin mit Essigsäure zugesetzt (auf 100 ccm Flüssigkeit gegen 2 ccm Phenylhydrazin in Essigsäure gelöst) und die Flüssigkeit ungefähr 1 Stunde lang auf dem Wasserbade erwärmt. Während des Kochens bildete sich gewöhnlich kein krystallinischer Niederschlag des Osazons; er fiel erst aus beim Erkalten der Flüssigkeit. Zwecks vollkommener Fällung der Krystalle liess man die Lösung 24 Stunden lang stehen. Makroskopisch gleicht dieser krystallinische Niederschlag völlig dem krystallinischen Niederschlag des Glycosazons. Mikroskopisch untersucht haben die Krystalle eine gelbe Färbung, sind nadelförmig und bilden gewöhnlich Gruppen in Stern- oder Büschelform. Zum Umkrystallisiren muss vorerst von der Oberfläche der Flüssigkeit eine harzige Schicht nach Möglichkeit entfernt werden, die beim Ausfallen der Krystalle gewöhnlich entsteht; dies ist mit Filtrirpapier leicht zu bewerkstelligen. Darauf wurde die Flüssigkeit abfiltrirt, der Niederschlag auf dem Filter sorgfältig mit Wasser gewaschen und in siedendem 95%igem Alkohol gelöst; die alkoholische Lösung wurde mit einem Ueberschuss von Wasser verdünnt und bis zur völligen Entfernung des Alkohols gekocht. Die Krystalle fielen wieder erst beim Erkalten aus. Das Umkrystallisiren wurde von uns gewöhnlich 3—4 Mal vorgenommen. Auf diesem Wege konnten vollkommen reine Krystalle dieses Osazons erhalten werden. Die Eigenschaften dieses letzteren sind folgende: es ist leicht löslich in Alkohol, Aether und siedendem Wasser (fällt erst beim Erkalten aus); der Schmelzpunkt liegt bei 183—185° C. (nach Pavy 189—190° C.). Beim Umkrystallisiren bleibt ihr Schmelzpunkt derselbe, was auf die Reinheit der erhaltenen Verbindung hinweist. Hier muss bemerkt werden, dass die Schmelzpunktsbestimmung für das Osazon von uns stets mit schnellem Erwärmen gemacht wurde, da nach den Untersuchungen von Tollens, Beythien und Maquenne¹⁾ bei langsamem Erwärmen der Schmelzpunkt um 20° niedriger erscheinen kann, als er ist. Was die Menge des Osazons betrifft, das man durch obenerwähnte Behandlung des Albumins erhalten kann, so muss man bemerken, dass die Bestimmung derselben ziemlich schwierig ist, da ein erheblicher Theil desselben beim Umkrystallisiren verloren geht. Jedenfalls ist die Menge im Verhältniss zum genommenen Eiweiss sehr unbe-

1) Tollens Handbuch der Kohlehydr. 1895. Bd. II. p. 34.

deutend. Dieser Umstand verhinderte uns, eine Elementaranalyse des erhaltenen Körpers zu machen; dazu wird man eine recht beträchtliche Menge von Eiweiss zur Verfügung haben müssen. Wenn man Eieralbumin zuerst mit 3—5%iger Salzsäure ca. 2 Stunden lang kocht, den unlöslichen Rest des Albumins abfiltrirt, sorgfältig mit Wasser auswäscht und dieses Albumin wieder mit Salzsäure kocht, so ist in der erhaltenen Lösung kein Osazon mehr mit Phenylhydrazin darstellbar. Bei der Trommer'schen Probe wird auch kein Niederschlag von Kupferoxydul erhalten, obgleich die Lösung offenbar reduziert, was durch die Reaction mit Ferricyankalium bewiesen werden kann (die Reduction ist allerdings viel schwächer als im ersten Fall). Schon nach kurzer Behandlung von Eiweiss mit Salzsäure kann man aus dem noch ungelösten Eiweiss keinen Körper darstellen, der mit Phenylhydrazin reagirt. Bisweilen erhält man dabei eine geringe Menge Niederschlag, der mikroskopisch aus sternförmigen gelben Krystallen besteht, aber ihrem Aussehen nach gleichen sie den oben beschriebenen sehr wenig: sie sind sehr dünn, verästelt und äusserst locker (beim leisesten Druck auf's Deckglas zerfliessen sie), und ausserdem gelingt es nicht, sie je umzukrystallisiren. Diese Versuche beweisen einerseits, dass vom Eiweiss durch Behandlung mit Säure sich leicht eine Kohlehydratgruppe abspalten lässt, und andererseits, dass aus der Reduction von Kupferoxyd in alkalischer Lösung noch nicht auf die Anwesenheit eines Kohlehydrates geschlossen werden darf. Die Frage, was denn im gegebenen Fall das Kupferoxyd reduciren kann, besprechen wir weiter unten.

Ausser mit Eieralbumin, das durch Gerinnung beim Kochen erhalten wurde, stellten wir noch Versuche mit Albumin an, das aus einer Lösung von Hühnereiweiss durch einen Ueberschuss von conc. Salzsäure in der Kälte gefällt wurde. Das Kochen dieses Albumins mit schwacher Salz- oder Schwefelsäure ergab ganz dieselben Resultate (es spaltete sich ein Körper ab, der Kupferoxyd reducirte und Osazonkrystalle gab).

Acidalbumin, auf gewöhnliche Weise durch Kochen von gereinigtem Eieralbumin mit Eisessig erhalten, giebt nach dem Kochen mit schwacher Salzsäure eine deutliche Reduction und die Reaction mit Phenylhydrazin, wie das Ausgangsalbumin.

Alkalialbumin, durch Lösen von gereinigtem Eieralbumin in Aetznatron und Ausfällung durch Neutralisation mit

Essigsäure erhalten, giebt ganz dieselben Resultate, wie das Eieralbumin. Hier muss bemerkt werden, dass die alkalische Lösung von Eieralbumin (z. B. bei der eben erwähnten Darstellung des Alkalialbumins) Kupferoxyd stark reducirt, was aus der Reaction mit Ferricyankalium ersichtlich ist. Dazu wurde die alkalische Lösung neutralisirt, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert, Ferricyankaliumlösung zugegossen — es entstand ein rothbrauner Niederschlag. Aber die Bildung eines Kohlehydrates in dieser alkalischen Lösung mittelst der Reaction mit Phenylhydrazin zu constatiren, ist nicht möglich. Dazu wurde die alkalische Eiweisslösung neutralisirt, filtrirt und mit Phenylhydrazin und Essigsäure behandelt, das Ergebniss war immer negativer Art.

Auf die Behauptung P a v y's hin, dass sich vom Eieralbumin unter der Einwirkung von Pepsin ein Kohlehydrat abspalte, das man mit Phenylhydrazin nachweisen könne, stellten wir folgende Versuche an: Gereinigtes Eieralbumin wurde für 24 Stunden bei 38° C. mit 0,2 %iger Salzsäure und Pepsin zum Verdauen aufgestellt. Vorher war das Pepsin sorgfältig mit Wasser vom Milchzucker befreit, der sich stets im käuflichen Pepsin findet. Das Eiweiss löst sich fast ganz; wir erhalten eine intensive Peptonreaction; die Lösung wird filtrirt. Beim Kochen des Filtrats mit einer alkalischen Kupferoxydlösung tritt eine kräftige Reduction ein, die mittelst der Reaction mit Ferricyankalium festgestellt wird. Das Filtrat wird neutralisirt und die Probe mit Phenylhydrazin und Essigsäure gemacht; es sind nicht die geringsten Spuren von Osazonkrystallen wahrzunehmen, selbst nicht beim Stehenlassen (zweimal 24 Stunden lang). Offenbar hat sich in die Versuche P a v y's irgend ein Fehler eingeschlichen (es ist übrigens befremdend, dass der Autor die Verdauung des Eiweisses bei 54° C. anstellt, d. h. wo die Pepsinwirkung schon bedeutend gehemmt ist, Seite 54).

Mein Versuch, vom Eieralbumin mit Hülfe von Wasser unter hoher Temperatur und Druck ein Kohlehydrat abzuspalten, ergab gleichfalls negative Resultate. Eieralbumin¹⁾ wurde im zugeschmolzenen Rohr mit Wasser 8 Stunden lang bei 130—140° C. erwärmt. Ein bedeutender Theil des Eiweisses ging in Lösung

1) Darunter ist stets auscoagulirtes und in der oben beschriebenen Weise gereinigtes Eieralbumin zu verstehen.

über; nach dem Erkalten gab die filtrirte Lösung die Reaction auf Pepton. Kupferoxyd wird stark reducirt (Probe mit Ferrieyankalium); mit essigsauerm Phenylhydrazin erhält man negative Resultate.

In Anbetracht dessen, dass bei der Trypsinverdauung eine Spaltung des Eiweissmolecüls stattfindet, hielt ich die Bildung von Kohlehydraten vom Eiweiss für leichter möglich bei der tryptischen als bei der peptischen Verdauung. Aber auch diese Vermuthung bewahrheitete sich nicht. Versuch: Eieralbumin wurde 48 Stunden lang bei 38° mit Trypsin verdaut (zur Vermeidung von Fäulniss war Chloroform zugefügt). Zum Verdauen diente pulverisirtes Pancreas, nach Kühne hergestellt. In dieser Zeit wurde bis auf einen geringen Rest alles verdaut. Reichliche Bildung von Peptonen, Leucin und Tyrosin (constatirt mikroskopisch, mit dem Millon'schen Reagens und durch die Piria'sche Probe). Die durch Neutralisiren, Kochen und Filtriren erhaltene Flüssigkeit reducirte reichlich Kupferoxyd, lieferte aber durchaus kein Osazon.

Albumose-Pepton, auf gewöhnliche Weise aus Eieralbumin dargestellt, reducirt in wässriger Lösung Kupferoxyd beim Kochen mit Fehling'scher Lösung. (Der Niederschlag von Kupferoxydul fällt gewöhnlich nicht aus, aber die stattgehabte Reduction lässt sich durch die Reaction mit Ferrieyankalium constatiren.) Dieses Albumose-Pepton ist vollständig frei von Zuckerbeimischung, was durch die Controlprobe mittelst Phenylhydrazin bewiesen wird. Kocht man das Albumose-Pepton mit 3–5% Salzsäure, so erweist sich, dass es noch mehr Reductionsfähigkeit erlangen und schon dabei kann man sich mit Hilfe des Phenylhydrazins von der stattgehabten Abspaltung eines Kohlehydrates überzeugen. Form und Charakter der Osazonkrystalle aus dem Albumose-Pepton sind ganz dieselben, wie aus dem ursprünglichen Albumin. Der Schmelzpunkt liegt bei 184–185° Cels.

Mehrmals versuchte ich aus dem Eieralbumin ein Kohlehydrat-Anhydrid abzuspalten, das voraussichtlich die Quelle für den Zucker sein könnte, der sich beim Kochen des Eiweisses mit Säuren bildet. Zu diesem Zweck wurde Eieralbumin eine Stunde lang mit 5%iger NaOH gekocht, nach dem Erkalten neutralisirt, filtrirt; das Filtrat wurde mit dem Brücke'schen Reagens behandelt, der dabei entstandene Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat mit 95% Alkohol behandelt (auf 1 Volum Flüssigkeit fast

3 Volum Alkohol). Durch den Alkohol entstand kein Niederschlag und so war denn der Versuch ein Kohlehydrat auf diese Weise abzuspalten vergeblich.

Fibrin, sorgfältig ausgewaschen, mit 3—5 %iger Salzsäure gekocht, giebt eine Kupferoxyd reducirende Lösung (ein Niederschlag von Kupferoxydul ist niemals zu bemerken, nur die Probe mit Ferricyankalium constatirt die Reduction der Kupferoxyds). Bei Behandlung dieser Lösung mit Phenylhydrazin erhält man eine unbedeutende Menge von Osazonkrystallen, deren Form und Eigenschaften an das erinnern, was wir beim Eialbumin gesehen haben. Der Schmelzpunkt liegt bei 182—184° Cels. Die Menge des aus dem Fibrin erhaltenen Osazons ist sehr gering im Vergleich zu dem, was aus dem Eialbumin erhalten wurde. Man könnte vielleicht die Vermuthung hegen, dass der nachgewiesene Zucker die Kohlehydrate der weissen Blutkörperchen zu seinem Ausgangspunkte habe, welche durch das Fibrin beim Gerinnungsprocess mechanisch mitgerissen werden, allein diese Vermuthung ist irrig, da auch das aus dem Fibrin dargestellte Albumose-Pepton, welches an sich mit Phenylhydrazin kein Osazon liefert, beim Kochen mit schwacher Salzsäure einen zuckerartigen Körper giebt, der mit Phenylhydrazin ein krystallinisches Osazon bildet; sein Schmelzpunkt liegt bei 182—184° Cels., d. h. bei derselben Temperatur, wie für das Osazon aus dem Fibrin selbst.

Blutalbumin. Rinderblutserum (1 Liter) mit $MgSO_4$ zur Entfernung des Globulins gesättigt; das Filtrat mit Essigsäure versetzt und gekocht; der Niederschlag von Albumin sorgfältig ausgewaschen. Diese ganze Menge Albumin 3 Std. lang mit 3—5 % Salzsäure gekocht; die Flüssigkeit filtrirt; das Filtrat reducirt stark Kupferoxyd (Probe mit Ferricyankalium). Bei Behandlung mit Phenylhydrazin bildet sich ein unbedeutender gelber Osazonniederschlag, über dessen Form und Eigenschaften dasselbe zu sagen ist, wie über die vorhergehenden. Sein Schmelzpunkt liegt bei 183—185° Cels.

Das Globulin des Blutes. Der Globulinniederschlag nach Sättigung eines Liters Serum mit $MgSO_4$, mehrmals mit concentrirter Lösung von $MgSO_4$ ausgewaschen, in Wasser gelöst und durch Kochen coagulirt. Kochen des Globulins mit schwacher Salzsäure gibt eine reducirende Flüssigkeit; mit Phenylhydrazin bildet sich eine sehr unbedeutende Menge von Osazon; der Schmelz-

punkt ist von mir nicht bestimmt, nach Mörner soll er bei 170 bis 172° Cels. liegen, mikroskopische Form und Eigenschaften sind dieselben, wie in den vorhergehenden Fällen.

Lactalbumin, durch Gerinnung beim Kochen nach Entfernung des Caseïns aus der Milch erhalten, gibt nach oben angegebener Behandlung mit Salzsäure eine Flüssigkeit, die Kupferoxyd in geringem Maasse reducirt; mit Phenylhydrazin sind nur Spuren von Osazon zu erhalten; mikroskopisch ist dieses dem Osazon aus Eialbumin sehr ähnlich; der Schmelzpunkt ist wegen Mangel an Material nicht bestimmt worden.

Caseïn, sorgfältig gereinigt, gibt beim Kochen mit schwacher Salzsäure eine Lösung, die kaum bemerkbar Kupferoxyd reducirt (Probe mit Ferrieyankalium).

Die Probe mit Phenylhydrazin ergibt vollständig negatives Resultat.

Gelatine (die käufliche) bildet nach 2 stündiger Behandlung mit 3–5% Salzsäure eine Lösung, die kaum merklich Kupferoxyd reducirt und mit Phenylhydrazin absolut keine Reaction auf Kohlehydrate gibt.

Vitellin, aus Eigelb von uns dargestellt, gab nach Kochen mit 3–5% Salzsäure ebenfalls negative Resultate bei der Probe mit Phenylhydrazin.

Mucoïd, aus Hühnereiweiss dargestellt, gab beim Kochen mit 5% HCl eine stark reducirende Flüssigkeit, in welcher bei der Probe mit Phenylhydrazin die Anwesenheit eines Kohlehydrats nicht zu constatiren war.

Von den Pflanzeneiweissen untersuchten wir das Erbseneiweiss: Erbsen wurden zum Quellen auf 24 Std. in Wasser gelegt, dann wurde das Wasser abgegossen; die gequollenen Erbsen wurden in einem Mörser mit Wasser zerrieben, und mit demselben 24 Std. lang stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde abfiltrirt und gekocht; nach Erkalten wurde etwas Speichel zur Saccharification von Stärke zugefügt und das Ganze bei 38° C. zum Verdauen stehen gelassen. Danach konnte in der Lösung keine Stärke mit Hilfe der Jodreaction mehr constatirt werden. Es wurde etwas Essigsäure hinzugefügt, wobei ein reichlicher Niederschlag von Nucleoalbumin entstand. Das Nucleoalbumin wurde sorgfältig ausgewaschen, und das Essigsäure enthaltende Filtrat zur Ausfällung des Albumins gekocht. Das Erbsenalbumin gibt nach Kochen mit 3–5%

Salzsäure eine Lösung, aus der mit Hilfe von Phenylhydrazin ein Kohlehydrat ausgeschieden werden kann; mikroskopisch hat dieses Osazon eine etwas andere Form, als die oben beschriebenen. Die Krystalle sind gelb, haben gleichfalls die Neigung stern- oder büschelförmige Gruppen zu bilden, aber sie sind sehr kurz und dick. Der Schmelzpunkt ist nicht bestimmt.

Das Nucleoalbumin aus den Erbsen. Hier findet beim Kochen mit 3—5% Salzsäure keine Abspaltung von Kohlehydratgruppen statt, was aus den gänzlich negativen Resultaten bei der Probe mit Phenylhydrazin zu ersehen ist.

Zum Schluss der Uebersicht über unsere Versuche muss bemerkt werden, dass es uns in keinem der erwähnten Fälle gelungen ist, eine Pentose in der Lösung nachzuweisen (nach Kochen des Eiweisses mit Säuren). Die Probe mit Phloroglucin und Salzsäure hatte immer negatives Resultat. Die Probe mit α -Naphtol und Schwefelsäure hatte immer positives Resultat.

Aus den oben geschilderten Versuchen ersehen wir, dass das Vorhandensein einer Kohlehydratgruppe bei weitem nicht in allen Eiweissstoffen nachzuweisen ist. Diese Gruppe bildet keinen charakteristischen, wesentlichen Bestandtheil des Eiweissmoleküls überhaupt, da sie einerseits nicht in allen Eiweissen nachzuweisen, andererseits in den verschiedenen Eiweissstoffen bei Weitem nicht in gleichen Mengen vorhanden ist und dabei unter der Einwirkung schwacher Säuren leicht abgespalten werden kann. Im letzteren Fall (z. B. bei kurzem Kochen mit Säure) verliert das Eiweiss seine Kohlehydratgruppe, bewahrt aber danach doch seine charakteristischen Eigenschaften, giebt alle für die Eiweisse charakteristischen Reactionen. Daraus ersehen wir nochmals, wie grosse Verschiedenheiten die Eiweisskörper in Bezug auf ihre Constitution und die Complicirtheit ihrer Zusammensetzung aufweisen. Dass die Kohlehydratgruppe aber keine einfache Beimengung zum Eiweiss darstellt, ist daraus ersichtlich, dass Acidalbumine, Alkalialbumine und Albumosepeptone bei Behandlung mit Säuren dieselben Resultate geben, wie das ursprüngliche Eiweiss.

Als P a v y den äusserst interessanten Fall von Abspaltung der Kohlehydratgruppe aus Eieralbumin gefunden hatte verallgemeinerte er ihn zu sehr und übertrug ihn auf die anderen Eiweiss-

körper, indem ihn die Eigenschaft der Eiweisskörper bestach, nach dem Kochen mit Säuren Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduciren. Er zog daraus den Schluss, dass die Eiweisskörper als Glucoside zu betrachten seien. Obgleich P a v y selbst fand, dass das Casein nach dem Kochen mit einer Säure nur eine sehr unbedeutende Reduction des Kupferoxyds bewirkt, so erklärte er es doch damit, dass er sagt: „es ist möglich, dass das Casein selbst ein stickstoffhaltiges Spaltungsprodukt ist, dessen complimentäres Kohlehydrat Lactose ist“ (pag. 35). Es ist klar, dass dies eine gezwungene Erklärung ist, da man auch für die übrigen Eiweissstoffe aus denen man kein Kohlehydrat abspalten kann, dasselbe zugeben müsste, was natürlich unmöglich ist. Indem P a v y von der Glucosidnatur der Eiweissstoffe spricht, führt er in dieser Beziehung eine Analogie mit dem Mucin durch, welches man unter gewissen Bedingungen in ein Protein und ein Kohlehydrat (thierisches Gummi, Landwehr) zerlegen kann. Ein derartiger Vergleich könnte angenommen werden. Aber man kann dem Autor nicht beistimmen, wenn er zwischen Eiweiss und Glucosiden eine noch grössere Analogie durchführen möchte, indem er sagt: „Pepton“ (d. h. nach Abspaltung des Kohlehydrats bei der Verdauung) „kann hinsichtlich der Proteïnbildung mit dem Asparagin und anderen verwandten stickstoffhaltigen Körpern des Pflanzenreiches verglichen werden, ja auch mit dem Ammoniumtartrat in Pasteur's Hefeculturflüssigkeit“ (pag. 238). Um einer solchen Aussicht beizustimmen, muss man das Pepton für einen Körper halten, der im Vergleich zum ursprünglichen Eiweiss sehr einfach ist und dabei keine Kohlehydratgruppe mehr enthält. Man kann weder das eine noch das andere zugeben, da die Albumose-Peptide, ebenso wie das Eiweiss selbst, noch eine Kohlehydratgruppe enthalten. Ausserdem wird durch unsere Untersuchungen bewiesen, dass durch Pepsin und Trypsin eine Kohlehydratgruppe aus dem Eiweiss nicht abgespalten werden kann. Vollkommen fällt die Analogie zwischen Eiweissen und Glucosiden weg, wenn wir uns erinnern, dass Wasser nach unseren Untersuchungen bei hohem Druck und Temperatur kein Kohlehydrat vom Eiweiss abspaltet, wie es doch bei Glucosiden der Fall ist. P a v y schloss auf die Abspaltung einer Kohlehydratgruppe vom Eiweiss unter diesen Bedingungen nur aus folgendem: „Nach der Behandlung von Eiweiss mit Wasser bei ca. 150° Cels. erhielt ich aus der Flüssigkeit ein Product, das un-

zweifelhafte Beweise für sein Reductionsvermögen gab“ (pag. 35). Die Reduction kann nichts für das Vorhandensein eines Kohlehydrats beweisen, da, wie wir oben gesehen haben, auch die Albumose-Peptide (gleichwie andere Eiweisskörper nach Krukenberg) zweifellos die Fähigkeit haben, Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduciren, was zu jeder Zeit durch die Reaction mit Ferricyankalium bewiesen werden kann. Drechsel hat gefunden, wie wir oben sahen (loc. cit.), dass eine solche Reduction selbst bei gewöhnlicher Temperatur möglich ist. Daher muss die Titirung des Zuckers mit Fehling'scher Lösung in Gegenwart von Albumose-Peptonen stets zu grosse Zahlen geben. Bei der Beurtheilung der Zahlen für die Glycosen bei Pavy muss man diesen Umstand im Auge behalten.

Das Enthaltensein der Kohlehydratgruppe in den Eiweisskörpern kann man auf Grund unserer Versuche bis zu einem gewissen Grade mit der Stellung der Xanthingruppe in den Nucleinen analogisiren. Aehnlich wie die Xanthinbasen (Xanthin, Guanin, Adenin etc.) nur einer gewissen Gruppe von Nucleinen zukommen, so erscheint auch die Kohlehydratgruppe als Spaltungsprodukt nur einer gewissen Anzahl von Eiweissstoffen.

Wir müssen die Kohlehydrate, die durch Säurewirkung von den verschiedenen Eiweissstoffen abgespalten werden, als miteinander identisch betrachten, da ihre Osazone alle den Schmelzpunkt 182–185° C. haben. So gleicht ihr Schmelzpunkt nicht dem der Osazone von Kohlehydraten, wie sie sich gewöhnlich im Organismus finden. Auf Grund dieser Eigenart des Kohlehydrates könnte man annehmen, dass dasselbe das Product einer nur künstlichen Spaltung des Eiweisses unter der Einwirkung schwacher Säuren und dass die Thatsache dieser Abspaltung von keiner direkten Bedeutung für die Physiologie und Pathologie des Kohlehydratstoffwechsels sei. Aber das können wir annehmen, dass sich die Kohlehydratgruppe im Organismus aus dem Eiweiss abspaltet, entweder direkt als Glycose oder erst als anderes Kohlehydrat, ähnlich dem von uns gefundenen, das sich nachher in Glycose umwandelt. Letztere Voraussetzung ist um so wahrscheinlicher, als die Umwandlung eines Kohlehydrates in ein anderes, zum Beispiel eines niederen in ein höheres im Laboratorium schon jetzt vollzogen wird. Denken wir z. B. an die Synthese von kohlen-

stoffreicheren Zuckerarten aus einfacheren durch Anlagerung von Blausäure und nachherige Reduction der dabei entstandenen Zuckercarbonsäuren mit Natriumamalgam. So sind z. B. aus der Glycose Heptose, Octose und Nonose dargestellt worden.

Die Thatsache der künstlichen Abspaltung einer Kohlehydratgruppe aus verschiedenen Eiweissarten kann schon als directer Beweis für die Möglichkeit gelten, dass sich beim Diabetes Kohlehydrate aus Eiweiss bilden. Deshalb werden Untersuchungen diabetischer Organe auf das Vorhandensein gerade dieser gebundenen Kohlehydrate ein besonderes Interesse haben. Die Annahme von Veränderungen in den Eiweissstoffen diabetischer Organe im Sinne der Anwesenheit jener gebundenen Kohlehydrate liegt um so näher, als meine früheren Untersuchungen¹⁾ gezeigt haben, dass das Knorpelgewebe der Diabetiker im Vergleich zum normalen viel mehr Kohlehydrate enthält, und zwar nicht nur freie, sondern auch gebundene (d. h. solche, die unter Einwirkung schwacher Säuren sich abspalten lassen). Ausserdem weisen die geschilderten Versuche darauf hin, dass Organe nach Verlust ihrer freien Kohlehydrate (Zucker, Glycogen) noch Kohlehydrate in gebundenem Zustande enthalten können. Wenn daher gesagt wird, dass beim Hungern die Kohlehydrate vollkommen aus den Organen verschwinden können, so kann man das jetzt nur mit der Einschränkung verstehen, dass diese Organe noch Kohlehydrate in gebundenem Zustande enthalten können. Wenn ein Thier bis zu einem gewissen Grade ohne freie Kohlehydrate in seinen Geweben auskommen kann, so müssen wir doch annehmen, dass der Verlust der gebundenen Kohlehydrate aus den Geweben unfehlbar das Thier zum Tode führen muss. Das Leben der Zelle ohne Kohlehydrate ist ebenso unmöglich, wie das Leben ohne Salze.

Zum Schluss möge es mir noch gestattet sein, Herrn Professor E. Salkowski meinen herzlichen Dank zu sagen für die Anregung zu dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung bei derselben.

1) Krawkow, Wartsch, 1899. Nr. 29.