

Untersuchungen über die basischen Spaltungsprodukte des Elastins beim Kochen mit Salzsäure.

Von
Ebbe Bergh, cand. med.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium zu Lund.)

(Der Redaction zugegangen am 22. Mai 1893.)

Untersuchungen über die Zersetzungsprodukte des Elastins beim Kochen mit Salzsäure wurden von Horbaczewski¹⁾ ausgeführt. Das Elastin, mit dem er arbeitete, war aus dem Ligamentum nuchae des Rindes dargestellt. Das fein zerschnittene Nackenband wurde mit häufig erneuertem Wasser während 3 bis 4 Tagen gekocht; hierauf wurde dasselbe mehrere Stunden mit 1%iger Kalilauge und dann mit Wasser mehrmals ausgekocht. Darauf wurde mit 10%iger Essigsäure gekocht. Die so erhaltene Substanz wurde mit 5%iger Salzsäure während 24 Stunden in der Kälte macerirt, wonach die Salzsäure mit Wasser ausgewaschen wurde. Nach Auskochen mit Wasser und Abpressen wurde die Substanz mit Alkohol gekocht und nach Auspressen desselben durch Extraction mit Aether von Fett befreit. Das auf diesem Wege erhaltene Elastin war ein gelbliches Pulver, das keinen Schwefel enthielt. Nachdem es 72 Stunden ununterbrochen mit Salzsäure und Zinnchlorür gekocht worden war, wurden als Zersetzungsprodukte Ammoniak (0,7%), (Amidovaleriansäure?), Leucin, Tyrosin (0,25%) und Glycocoll erhalten. Glutaminsäure und Asparaginsäure waren nicht zu finden.

Neuerdings hat Schwarz²⁾ eine Untersuchung über die

1) Sitzungsber. der kaiserl. Akad. d. Wissensch. II. Abthlg. 1885.

2) Zeitschrift f. Physiologische Chemie, Bd. XVIII, S. 487.

elastische Substanz der Aortawand vorgenommen. Die Aorta des Rindes wurde in möglichst zerkleinertem Zustande bei einer Temperatur von 17 bis 22° der Einwirkung von künstlichem Magensaft ausgesetzt. Die vom Magensaft nicht digerirte Masse wurde mit Wasser, das durch Sodalösung schwach alkalisch gemacht worden war, ausgewaschen. Nachdem durch Behandeln mit Wasser die Sodalösung entfernt war, wurde die Substanz mit oft erneuertem Wasser so lange gekocht, bis die Flüssigkeit klar abfloss und keine organische Substanz enthielt. Darauf wurde mit 5%iger Salzsäure während 24 Stunden in der Kälte macerirt. Die Salzsäure wurde durch Behandeln mit Wasser entfernt, wonach die elastische Substanz mit Alkohol und Aether entfettet wurde. Das nach dieser Methode isolirte Elastin war schwefelhaftig, aber der Schwefel konnte durch Kochen mit 1%iger Kalilauge entfernt werden. Nachdem die elastische Substanz während 80 Stunden mit Salzsäure und Zinnchlorür gekocht worden war, gelang es Schwarz, aus den Zersetzungsprodukten Lysatinin, Leucin, Tyrosin und Glycocoll zu isoliren, Glutaminsäure und Asparaginsäure aber nicht. Auf Grund der Uebereinstimmung der procentischen Zusammensetzung sowie der Zersetzungsprodukte hält Schwarz für bewiesen, dass das Aorta-Elastin und das Elastin vom Ligamentum nuchae identisch sind.

Ich gehe jetzt zu dem Berichte meiner eigenen Untersuchungen über, und weil ich dabei mit Elastin gearbeitet habe, das verschiedenen Ursprung hatte und nicht auf dieselbe Weise dargestellt worden war, will ich jede Untersuchung für sich beschreiben.

I.

Ligamenta nuchae vom Rinde, von Muskeln und Bindegewebe befreit, wurden fein zerschnitten und mehrere Stunden mit oft erneuertem Wasser ausgekocht. Darauf wurden sie abwechselnd mit 5%iger Schwefelsäure und 5%iger Natronlauge auf dem Wasserbade erhitzt. Nachdem die so erhaltene Substanz mit Wasser ausgekocht worden war, wurde sie mit 5%iger Salzsäure während 24 Stunden macerirt. Die Salz-

säure wurde durch Waschen mit Wasser entfernt. Nach Auskochen mit Wasser und Abpressen wurde der Rückstand mit künstlichem Magensaft bei $+39^{\circ}$ digerirt. Hierbei wurde etwas gelöst, das die Biuretreaction sowie auch Niederschlag mit Phosphorwolframsäure und mit Quecksilberjodidjodkalium gab. Der vom Magensaft nicht gelöste Rückstand wurde mit Wasser ausgewaschen und gekocht. Mit Alkohol und Aether wurde entfettet und darauf getrocknet. So erhielt ich eine gelbliche Substanz von feinen Fäden und Flocken.

Das auf diese Weise isolirte Elastin, das 250 gr. wog, wurde mit 1000 ccm. 20%iger Salzsäure und 25 gr. Zinn während 72 Stunden gekocht. Die beim Anfange des Kochens entwickelten Gase gaben einen Niederschlag von PbS in einer Lösung von Bleiacetat. Folglich war die elastische Substanz schwefelhaltig. Nach Entfernung des Zinns wurde die warme Lösung mit einer warmen Lösung von Phosphorwolframsäure versetzt, wobei ein krystallinischer Niederschlag entstand. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt und mit einer 5%igen Lösung von Schwefelsäure, die mit Phosphorwolframsäure versetzt worden war, chlorfrei gewaschen. Der Niederschlag wurde mit Kalkhydrat in Wärme zerlegt, der Ueberschuss von Kalk mit Oxalsäure entfernt, Silbernitrat in Ueberschuss zugesetzt und vom entstandenen Niederschlage filtrirt. So erhielt ich eine klare, stark alkalische Flüssigkeit, die nach Concentriren nicht krystallisirte. Nach Zugabe von Barythydrat und nachdem der Barytüberschuss durch Kohlensäure entfernt war, versuchte ich durch Concentriren der Lösung das Argininsilbersalz $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ zum Krystallisiren zu bringen, aber ohne Resultat. Auch ein Versuch, das Argininnitrat nach erneuerter Fällung mit Phosphorwolframsäure darzustellen, blieb ohne Erfolg. Die Lösung wurde verdünnt, durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit, mit Kupferoxydhydrat versetzt und erwärmt. Eine blaue Lösung entstand, aus der ich vergebens das Argininkupferniträt zu isoliren versuchte. Die eingetrocknete Masse war in Aether, Amylalkohol und Chloroform unlöslich. Aus der concentrirten Wasserlösung wurde

durch Alkohol ein blaues Oel abgeschieden, das aber nicht erstarrte oder krystallisirte.

II.

100 gr. Elastin (Grübler) wurden mit 400 cem. 20^oiger Salzsäure und 10 gr. Zinn während 72 Stunden gekocht. Auch dieses Elastin zeigte sich schwefelhaltig.

Nach Entfernung des Zinns wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde ausgewaschen, mit Kalkhydrat in der Wärme zerlegt, der Kalk entfernt und die mit Schwefelsäure angesäuerte Flüssigkeit noch einmal mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der neue Niederschlag wurde mit Barythydrat in der Wärme zerlegt, der Barytüberschuss als Baryumsulfat entfernt und die filtrirte Ba- und H₂SO₄-freie Lösung mit Silbernitrat versetzt. Der jetzt entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt und die klare alkalische Flüssigkeit concentrirt. Beim Aufbewahren der Lösung wurden aber keine krystallinischen Produkte erhalten. Aus der concentrirten Lösung wurde vom Alkohol ein dickes Oel abgeschieden, das aber weder erstarrte noch krystallisirte.

Ein Versuch, die Nitrate der freien Basen darzustellen, war ohne Erfolg. Auch gelang es mir nicht, irgend welche krystallinische Kupferverbindungen zu isoliren.

Nach diesem Versuche über die elastische Substanz des Ligamentum nuchae habe ich mit Elastin gearbeitet, das der Aorta thoracica des Rindes entstammte. Um das Elastin darzustellen, schlug ich folgendes Verfahren ein. Die Aorta, von Fett und Bindegewebe befreit, wurde in möglichst fein zerschnittenem Zustande mehrere Stunden mit häufig erneuertem Wasser ausgekocht und darauf ausgepresst. Die Substanz wurde in zwei gleich grosse Portionen getheilt und jede Portion für sich behandelt.

III.

Aus der einen Portion habe ich Elastin nach der Methode von Horbaczewski dargestellt, wobei 103 gr. Elastin erhalten wurden.

Die im Exsiccator zum constanten Gewicht getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werthe:

1.	0,2172	gr. Subst. lieferten	0,0017	gr. Asche = 0,78 %
2.	0,2284	»	0,0016	» = 0,70 %
3.	0,2155	»	0,1538	H ₂ O=0,01708 gr. H= 7,92 % ¹⁾
	0,2155	»	0,4263	CO ₂ =0,11626 » C=53,948 %
4.	0,2268	»	0,1452	H ₂ O=0,01646 » H= 7,25 %
	0,2268	»	0,4487	CO ₂ =0,122372 » C=53,955 %
5.	0,2190	»	0,03416	N = 15,59 % ²⁾
6.	0,2178	»	0,03374	N = 15,49 %
7.	0,79895	»	0,03208	gr. Ba SO ₄ =0,004111 gr. S = 0,55 % ³⁾

	I	II	III	IV	V	VI	VII	Mittel
Asche %	0,78	0,70						0,74 %
C %			53,948	53,955				53,95 %
H %			7,92	7,25				7,58 %
N %					15,59	15,49		15,54 %
S %							0,55	0,55 %

100 gr. dieser Substanz wurden mit 400 ccm. 20%iger Salzsäure und etwas Zinn während 72 Stunden gekocht. Nach Entfernung des Zinns wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag, der sehr klein war, wurde mit Barythydrat zerlegt, der Barytüberschuss mit Schwefelsäure entfernt, Silbernitrat in Ueberschuss zugegeben, vom entstandenen Niederschlag filtrirt, concentrirt. Nach dem gewöhnlichen Verfahren versuchte ich sowohl Arginin- wie Lysinsilberverbindungen zu isoliren, aber ohne Erfolg. Zusatz von Alkohol und Aether bewirkte nur die Abscheidung von einem dicken Oel, das aber weder erstarrte noch krystallisirte.

Ein Versuch, krystallinische Kupferverbindungen darzustellen, blieb auch ohne Erfolg.

1) Auf aschenfreie Substanz berechnet.

2) Nach Kjeldahl.

3) Nach Hammarsten.

IV.

Die andere Portion wurde mehrmals mit oft erneuertem Wasser ausgekocht und darauf abgepresst. Aus dem Rückstand wurde in völliger Uebereinstimmung mit der Methode von Schwarz die elastische Substanz dargestellt. Durch das vorausgegangene Kochen wollte ich soviel wie möglich vom Collagen und von der von Schwarz erwähnten, nach der Pepsindigestion zurückbleibenden Proteinsubstanz entfernen. Nach dieser etwas modificirten Methode von Schwarz wurden 118 gr. Elastin erhalten.

Die im Exsiccator zum constanten Gewicht getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werthe:

1.	0,2196	gr. Subst. lieferten	0,0011	gr. Asche = 0,50 ‰
2.	0,2266	»	0,0012	» = 0,52 ‰
3.	0,2185	»	0,1466	» H ₂ O = 0,016288 gr. H = 7,45 ‰
	0,2185	»	0,4276	» CO ₂ = 0,16618 » C = 52,37 ‰
4.	0,2254	»	0,1493	» H ₂ O = 0,016588 » H = 7,35 ‰
	0,2254	»	0,4408	» CO ₂ = 0,120218 » C = 53,33 ‰
5.	0,21192	»	0,03143	» N = 14,83 ‰
6.	0,26286	»	0,03815	» N = 14,51 ‰
7.	2,17426	»	0,08908	» Ba SO ₄ = 0,01224 gr. S = 0,56 ‰
8.	2,59898	»	0,14748	» = 0,020249 » S = 0,77 ‰

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Mittel
Asche ‰	0,50	0,52							0,51
C ‰			53,37	53,33					53,35
H ‰			7,45	7,35					7,40
N ‰					14,83	14,51			14,67
S ‰							0,56	0,77	0,66

100 gr. dieses Elastins wurden wie gewöhnlich mit Salzsäure und Zinn behandelt und die basischen Spaltungsprodukte mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag war hier bedeutend grösser als der bei dem vorigen Versuche. Nach Zerlegen des Niederschlages durch Barythydrat wurde der Barytüberschuss mit Schwefelsäure entfernt. Zu der Ba- und

H₂SO₄-freien, alkalisch reagirenden Lösung wurde Silbernitrat zugegeben und vom entstandenen Niederschlage filtrirt. Aus dieser Lösung von Silberverbindungen versuchte ich vergebens krystallisirende Produkte zu isoliren. Aus der concentrirten Wasserrösung wurde durch Zusatz von Alkohol und Aether nur ein dickes Oel abgeschieden.

Wie aus dem oben Erwähnten hervorgeht, ist es mir nicht gelungen, die bei der Zersetzung aller bisher untersuchten Proteinkörper gebildeten Basen Arginin und Lysin unter den Spaltungsprodukten des Elastins zu finden. In Bezug auf das Arginin wissen wir durch die Untersuchungen von Hedin,¹⁾ dass bei der Zersetzung der Proteinkörper mit Salzsäure verschiedene Mengen gebildet werden. Ich citire hier die von Hedin gefundenen Ziffern:

Conglutin	gibt wenigstens	2.75	0 0	Arginin
Leim	» »	2.6	0 0	»
Albumin aus Eigelb	» »	2.3	0 0	»
Hornsubstanz	» »	2.25	0 0	»
Albumin aus Eiweiss	» »	0.8	0 0	»
Eingetrocknetes Blutserum	» »	0.7	0 0	»
Casein	» »	0.25	0 0	»

Theoretische Gründe existiren nicht, die die Annahme verhindern, dass diese Serie sich bis 0 erstrecken könnte, also dass Proteinkörper existirten, die bei ihrer Zersetzung mit Salzsäure kein Arginin lieferten. Vielleicht verhalten sich die Proteinkörper auf dieselbe Weise in Bezug auf die übrigen basischen Spaltungsprodukte.

Freilich geht aus meinen Untersuchungen nicht unzweideutig hervor, dass Lysin und Arginin bei der Zersetzung des Elastins mit Salzsäure nicht gebildet werden, aber soviel scheint doch sicher gestellt zu sein, dass die genannten Basen nach den üblichen Methoden nicht isolirt werden können.

1) Zeitschr. für Physiol. Chemie, Bd. XXI, Heft 2 und 3.