

Untersuchungen über tierische Leimstoffe.

II. Mitteilung.

Über Knorpelglutine (Gluteine).

Von

Wl. S. Sadikoff aus St. Petersburg.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. August 1903.)

Glutin aus Knorpel wurde von C. Th. Mörner¹⁾ dargestellt. Er benutzte zwei verschiedene Methoden. 1. Fein zerkleinerter Trachealknorpel erwachsener Rinder wird durch Digestion mit $\frac{1}{100}$ 0/oiger Kalilauge bei 40° von präformierter Chondroitinschwefelsäure und darauf mit 0,2 bis 0,3 0/oiger Salzsäure bei derselben Temperatur behandelt. Dabei geht im Verlauf von einigen Tagen ein großer Teil des Collagens in Lösung, während Chondromukoid und Albumoid zurückbleiben. Aus der Digestionsflüssigkeit scheidet sich das Glutin bei Sättigung mit Natriumsulfat als flockige Fällung aus, deren Lösung in wenig Wasser mittels Dialyse gegen lauwarmes Wasser von Salz und Säure befreit wird. 2. Das gleiche Material wird durch Digestion mit täglich gewechselter 0,2 bis 0,5 0/oiger Kalilauge von Chondromukoid und Chondroitinschwefelsäure völlig befreit, mit Wasser bis zur vollkommenen Entfernung der Kalilauge ausgewaschen und dann im Papinschen Topf bei 110° mit Wasser erhitzt. Dabei bleiben Albumoid und Knorpelzellen ungelöst, während Collagen als Glutin in Lösung geht.

Die nach beiden Verfahren erhaltenen Lösungen gelatinieren und gaben alle Reaktionen des Glutins. Die aus den Lösungen isolierten Glutine enthielten 16,14 0/o Stickstoff als

¹⁾ Skand. Arch. f. Physiol., 1, 232 (1889).

Durchschnitt mehrerer gut übereinstimmender Analysen verschiedener Präparate. Nach dem Kochen mit verdünnter Salzsäure reduzierten sie in geringem Grade Fehlingsche Lösung. Mörner spricht sich nicht darüber aus, ob er diese Reduktion auf eine Verunreinigung mit Chondroitinschwefelsäure oder Chondromukoid bezieht, oder dem Glutin selbst zuschreibt. Weitere Angaben über dieses Trachealknorpelglutin hat Mörner nicht gemacht.

Auf Veranlassung von Prof. Thierfelder habe ich die Untersuchung über Knorpelleim aufgenommen. Als Material diente mir der hyaline Knorpel der Nasenscheidewand des Schweines und der Trachea des Rindes, sowie der elastische Knorpel der Ohrmuschel des Schweines.

Darstellung. Dieselbe geschah nach der zweiten der von Mörner angegebenen Methoden, nachdem mir die erste nur eine geringe Ausbeute gegeben hatte. Auf die Präparation wurde die größte Sorgfalt verwendet, auch das Perichondrium völlig entfernt und nur reines Knorpelgewebe in Arbeit genommen. Die Kalilauge (0,25%) ließ ich in der Regel fünf Tage lang unter täglichem Wechsel einwirken. In einem Fall (Präparat I des Nasenscheidewandknorpels) wurde die Behandlung mit Kalilauge 3 Monate lang fortgesetzt und die Konzentration zuletzt bis auf 1% gebracht; dabei ließ sich eine geringe Ammoniakentwicklung nachweisen. Die völlige Entfernung der Kalilauge durch Wasser, welche bei Gegenwart von Antiseptics (siehe darüber Seite 397) geschah, erforderte sehr viel Zeit; sie ist durchaus nötig, da, wie auch Mörner angibt, schon Spuren von zurückgebliebenem Alkali beim nachträglichen Kochen Albuminoid in Lösung bringen. Ich hörte mit dem Auswaschen erst auf, wenn sich gezeigt hatte, daß eine kleine Probe, in heißem Wasser gelöst, ein Lackmuspapier auch nach längerer Einwirkung nicht mehr färbte. Bei dem Ohrknorpel machte das Auswaschen des Alkali besondere Schwierigkeit, es gelang hier erst bei mehrwöchigem starken Schütteln des Gewebes mit häufig gewechseltem Wasser in der Schüttelmaschine. Die von jeder Spur Alkali befreiten Gewebsrückstände wurden mit Wasser erhitzt, um das Collagen in Glutin überzuführen. Beim Nasen-

und Trachealknorpel genügt für diesen Zweck Erwärmen auf dem Wasserbad, schon nach einer Stunde war der größte Teil in Lösung gegangen. Der durch Seide abkolierte Rückstand wurde mit neuem Wasser erwärmt. Ein Erhitzen im Papinschen Topf, wie es Mörner anwandte, war nicht nötig. Der Ohrknorpel verhielt sich anders: hier mußte bei 110° erhitzt werden, um das Collagen in Lösung zu bringen. Der Rückstand stellte eine graue elastische Masse dar, welche außer den anderen in Wasser unlöslichen Stoffen das Elastin enthielt. Die filtrierten Lösungen wurden nicht eingeeengt, sondern direkt mit Alkohol gefällt, die Niederschläge mit Alkohol gewaschen, im Vacuum getrocknet, gepulvert und mit Äther extrahiert (wobei nur sehr wenig in Lösung ging). Sie stellen schöne weiße, etwas hygroskopische lockere Pulver dar, in kaltem Wasser unlöslich, in heißem Wasser leicht löslich. Die Lösungen gelatinieren beim Erkalten. Die Reaktionen sind die des Glutins; die Millonsche Reaktion ist deutlich ausgeprägt, besonders bei Ohrknorpelglutin.

Wegen einiger charakteristischen, später zu erwähnenden Reaktionen, welche alle diese Präparate von dem Bindegewebsglutin unterscheiden, schlage ich für die Knorpelglutine den Namen Gluteine vor.

Zur Analyse kamen drei verschiedene Präparate von Nasenglutin, zwei Präparate von Ohrglutin und ein Präparat von Trachealglutin, doch wurden von letzteren beiden nur Schwefel-, bzw. Stickstoff- und Schwefelbestimmungen ausgeführt. Das Trocknen geschah bei 110° . Wegen der benutzten analytischen Methoden siehe die vorstehende Arbeit (S. 399).

Analysen.

Nasenglutin I.

Asche = 1,61%.

Kohlenwasserstoff:

- | | | | | | | | |
|----|------------------------|-------|----------|-----------------|-----|----------|------------------|
| 1. | 0.1995 g ¹⁾ | geben | 0.3660 g | CO ₂ | und | 0.1285 g | H ₂ O |
| 2. | 0.2098 | » | 0.3860 | » | » | 0.132 | » |

¹⁾ Die Substanzmengen sind stets aschefrei berechnet.

Stickstoff nach Kjeldahl:

1. 0.2055 g erfordern 23.65 ccm $n/10$ H_2SO_4
2. 0.1997 » » 22.8 » » »
3. 0.2035 » » 23.65 » » »
4. 0.2113 » » 24.35 » » »

Stickstoff nach Dumas:

1. 0.1365 g geben 21.3 ccm N bei 20° und 756 mm Hg
2. 0.1472 » » 22.8 » » » 19.5° » 767 » »
3. 0.1298 » » 20.4 » » » 18° » 747 » »
4. 0.1547 » » 24.1 » » » 19.5° » 752 » »

Schwefel nach Liebig:

1. 0.9495 g geben 0.0278 g $BaSO_4$
2. 0.7501 g » 0.0210 » »

Schwefel nach Asbóth:

1. 1.1313 g geben 0.0305 g $BaSO_4$
2. 0.9249 » » 0.0270 » »
3. 0.7671 » » 0.0216 » »

	1	2	3	4	Mittel
C	50.20	50.23	—	—	50.22
H	7.21	7.04	—	—	7.12
N (Kjeldahl)	16.12	15.98	16.28	16.13	16.12
N (Dumas)	17.85	17.90	17.84	17.69	17.81
S (Liebig)	0.547	0.523	—	—	0.535
S (Asbóth)	0.504	0.546	0.526	—	0.525

Nasenglutein II.

Asche = 1.08%

Kohlenwasserstoff:

1. 0.2018 g geben 0.3727 g CO_2 und 0.123 g H_2O
2. 0.2525 » » 0.4645 » » » 0.1528 » »

Schwefel nach Liebig:

1. 0.7508 g geben 0.0250 g $BaSO_4$
2. 0.9556 » » 0.0328 » »
3. 0.9729 » » 0.0315 » »

Schwefel nach Asbóth:

1. 0.9962 g geben 0.0336 g $BaSO_4$
2. 1.0515 » » 0.0340 » »
3. 1.0559 » » 0.0380 » »

	1	2	3	Mittel
C	50.42	50.18	—	50.30
H	6.82	6.77	—	6.80
S (Liebig)	0.622	0.642	0.605	0.623
S (Asbóth)	0.630	0.604	0.673	0.638

Nasenglutein III.

Asche = 1.19%.

Kohlenwasserstoff:

- 0.2151 g geben 0.3972 g CO₂ und 0.1345 g H₂O
- 0.2221 » » 0.4110 » » 0.1397 » »

Stickstoff nach Kjeldahl:

- 0.1976 g erfordern 24 ccm ^{n/10} H₂SO₄ (2ständiges Kochen)
- 0.2002 » » 24.2 » » » » » »
- 0.2118 » » 25.75 » » » (15ständiges Kochen)
- 0.2056 » » 25.05 » » » » » »

Stickstoff nach Dumas:

- 0.1571 g geben 24,15 ccm N bei 16° und 751 mm Hg
- 0.1457 » » 22.55 » » » 18.5' » 755 » »

Schwefel nach Liebig:

- 1.0286 g geben 0.0320 g BaSO₄
- 0.9038 » » 0.0300 » »

Schwefel nach Asbóth:

- 0.8807 g geben 0.0321 g BaSO₄
- 0.8246 » » 0.0282 » »

	1	2	3	4	Mittel
C	50.41	50.52	—	—	50.46
H	7.00	7.04	—	—	7.02
N (Kjeldahl)	17.00	16.92	17.02	17.06	17.00
N (Dumas)	17.71	17.72	—	—	17.72
S (Liebig)	0.595	0.620	—	—	0.607
S (Asbóth)	0.681	0.639	—	—	0.610

Trachealglutein.

Asche = 1.2%.

Stickstoff nach Kjeldahl:

- 0.2018 g erfordern 25 ccm ^{n/10} H₂SO₄
- 0.2036 » » 25.35 » » » »
- 0.1876 » » 23,4 » » » »
- 0.1940 » » 24,35 » » » »

Stickstoff nach Dumas:

1. 0,1446 g geben 22,5 ccm N bei 21° und 764 mm Hg
2. 0,1460 „ „ 23,2 „ „ „ 20° „ 755 „ „
3. 0,1594 „ „ 23,9 „ „ „ 17° „ 779 „ „
4. 0,1489 „ „ 23,2 „ „ „ 16° „ 743 „ „

Schwefel nach Liebig:

1. 1,0554 g geben 0,0410 g BaSO₄
2. 0,9047 „ „ 0,0270 „

Schwefel nach Asbóth:

1. 1,0039 g geben 0,0368 g BaSO₄

	1	2	3	4	Mittel
N (Kjeldahl)	17,35	17,43	17,47	17,57	17,46
N (Dumas)	17,82	18,08	17,84	17,76	17,87
S (Liebig)	0,726	0,702	—	—	0,714
S (Asbóth)	0,685	—	—	—	0,685

Ohrglutein I.

Asche = 1,1%.

Schwefel nach Liebig:

1. 0,7415 g geben 0,0280 g BaSO₄
2. 0,7564 „ „ 0,0290 „

Schwefel nach Asbóth:

1. 0,7529 g geben 0,0275 g BaSO₄
2. 0,5280 „ „ 0,0201 „

Ohrglutein II.

Asche = 1,0%.

Schwefel nach Liebig:

1. 0,9649 g geben 0,0335 g BaSO₄
2. 1,2989 „ „ 0,0410 „

Schwefel nach Asbóth:

1. 0,8644 g geben 0,0295 g BaSO₄
2. 1,0390 „ „ 0,0373 „

	I			II		
	1	2	Mittel	1	2	Mittel
S (Liebig)	0,706	0,717	0,712	0,649	0,590	0,619
S (Asbóth)	0,683	0,712	0,698	0,638	0,671	0,654

Durchschnittliche Zusammensetzung der Gluteine.

	Nasenglutein			Tracheal- glutein	Ohrlutein	
	I	II	III		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 (Asbóth)	0,525	0,638	0,610	0,685	0,698	0,654

Die bisher analysierten Gluteine unterscheiden sich von dem von mir dargestellten Sehnenglutin (siehe Tabelle Seite 405) durch ihren niedrigeren Kohlenstoff- und Stickstoff- und höheren Schwefelgehalt. Auffallend sind die Differenzen in den Stickstoffwerten nach Kjeldahl und Dumas. Schon bei den Analysen des Sehnenglutins (Seite 405) traten diese Unterschiede hervor; konnte man sie da allenfalls noch als innerhalb der Fehlergrenze liegend betrachten, so ist das hier nicht möglich. Beim Nasenglutein sind die Unterschiede zu groß. Es wurde immer nach Kjeldahl zu wenig gefunden und die Werte nach Kjeldahl bleiben dieselben, gleichgültig ob man 2 Stunden oder 15 Stunden lang erhitzt. Die Gluteine gehören also, ebenso wie die von mir analysierte Handelsgelatine (Seite 409), bei der diese Differenzen auch sehr auffallend waren, zu den Substanzen, welche bei der Kjeldahl-Methode keine zuverlässigen Werte gaben. Mörner hatte bei Trachealknorpelglutein nur 16,14% N gefunden; vielleicht ist dieser niedrige Wert auch dem Umstand zuzuschreiben, daß Mörner seine Bestimmungen nach Kjeldahl ausführte. Der niedrigere Schwefelgehalt in Nasenglutein I ist vermutlich auf die außerordentlich lange Einwirkung der Kalilauge bei der Darstellung dieses Präparats zurückzuführen (Seite 412). Vergleiche hiermit auch das Seite 407 Gesagte.

Reaktionen. Alle von mir dargestellten Gluteine unterscheiden sich von dem Sehnenglutin und der Handelsgelatine in den folgenden Reaktionen.

1. Sie reduzieren nach der Säurespaltung in sehr schwachem Grade Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Diese Reduktion gibt sich nicht durch eine Abscheidung von Kupferoxydul, sondern nur in einer Entfärbung zu erkennen. Sie wird am besten in folgender Weise ausgeführt: Nach einstündigem Erhitzen von Glutein in 10%iger Salzsäure im Wasserbad macht man die erkaltete Flüssigkeit alkalisch, fügt ein wenig Kupfersulfat hinzu, bis eine deutliche Färbung entsteht (und zwar eine grüne, da die Flüssigkeit gelblich ist) und teilt in zwei Teile. Bei dem Erhitzen der einen Probe zum Kochen tritt Entfärbung ein, was beim Vergleich mit der anderen besonders deutlich zu beobachten ist. Die gekochte Lösung oxydiert sich nach einiger Zeit und nimmt wieder die Farbe der Vergleichsflüssigkeit an. Diese Reaktion ist nicht etwa auf zurückgebliebene Chondroitinschwefelsäure zu beziehen, denn sie gelang auch in gleicher Weise mit einem Präparat, das einem Knorpel entstammte, welcher monatelang mit 0,25—1%iger Kalilauge extrahiert worden war (Nasenglutein I). Daß die Extraktion eine vollständige war, ging daraus hervor, daß die letzten Alkaliauszüge keine Substanz enthielten, welche nach Kochen mit Säure die Reduktionsprobe gab.

2. Sie geben eine Reaktion mit Phloroglucinsalzsäure. Diese ist allerdings bei Benutzung von konzentrierter Salzsäure und Phloroglucin sehr undeutlich, wird aber scharf, wenn man eine mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzte konzentrierte Salzsäure anwendet (A. Neumann).¹⁾ Es tritt dabei beim Erwärmen im kochenden Wasserbade in einiger Zeit eine schwache Braunfärbung ein, die vielleicht einen Stich ins Rötliche hat. Die spektroskopische Prüfung ergibt einen ausgeprägten Streifen im Gelb, der wohl etwas breiter als der

¹⁾ Auf die verschärfende Wirkung des Alkohols hat Herr A. Neumann mich freundlichst aufmerksam gemacht. Derselbe hat beobachtet, daß die Tollenssche Pentosereaktion mit Phloroglucin sehr viel schärfer wird, bezw. bei manchen Stoffen überhaupt erst eintritt, wenn man eine mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzte konzentrierte Salzsäure verwendet. Herr A. Neumann wird über diese Modifikation der Tollensschen Probe demnächst ausführlich berichten.

Pentosestreifen ist. Bei weiterem Erhitzen wird dieser Streifen allmählich undeutlicher, während ein anderer im Rot aufzutreten beginnt, zuerst als Schatten, dann immer deutlicher, und schließlich ganz scharf werdend. Erhitzt man noch länger, so beobachtet man schließlich nur den roten, der einige Zeit bestehen bleibt. Da diese Gluteinreaktion sehr subtil ist und durch die beim Erhitzen auftretenden Zersetzungsprodukte gestört wird, so ist es nötig, sehr häufig, fast jeden Augenblick, mit dem Spektroskop zu prüfen, um den oben geschilderten Verlauf beobachten zu können¹⁾. Auch darf die Substanzmenge nicht zu klein sein, mindestens 0,5 g. Zu erwähnen ist noch, daß die Reaktion versagte, als ich sie mit Nasengluteinpräparaten anstellte, welche 12 Stunden auf 135° erhitzt worden waren.

Diese beiden Reaktionen geben weder Bindegewebsglutin, noch käufliche Gelatine. Glutin aus Hausenblase reduziert nach dem Kochen mit Säure auch nicht: der Phloroglucinsalzsäurereaktion gegenüber verhält sie sich anders, insofern man nur einen ganz schwachen Schatten im grünen Teile des Spektrums wahrnimmt. Längeres Kochen bringt ihn nicht zum Verschwinden, bewirkt auch nicht das Auftreten eines Streifens im Rot.

Einwirkung von schwacher Salzsäure. Um den etwas hohen Aschegehalt meiner Präparate zu verringern, versuchte ich sie aus mit Salzsäure (bis zu 0,2%) bei Zimmertemperatur versetzter wässriger Lösung mit Alkohol zu fällen. Hierbei trat aber keine flockige Abscheidung ein, vielmehr eine dicke milchige Trübung, aus der sich nur eine geringe Menge Niederschlag abschied. Erst auf Zusatz von mehreren Tropfen konzentrierter Kochsalzlösung kam es zu einer Fällung und die überstehende Flüssigkeit wurde allmählich vollkommen klar filtrierbar. Auf den in Lösung gebliebenen Teil komme ich zurück. Der Niederschlag, welcher durch wiederholtes Lösen in kaltem Wasser und Fällen mit Alkohol, sowie durch Dialyse

¹⁾ Nach persönlicher Mitteilung hat Herr A. Neumann dieselbe Reaktion bei phosphorhaltigen Substanzen aus Faeces und Thymus, sowie in einem diabetischen Harn beobachtet.

seiner neutralisierten wässrigen Lösung von Salzsäure und Aschebestandteilen möglichst befreit wurde, verhielt sich anders als die ursprüngliche Substanz. Er war in kaltem Wasser löslich geworden¹⁾ und zeigte eine andere Zusammensetzung.

Nasenglutein I nach Umfällen aus saurer Lösung.

Asche = 1,4%.

Kohlenwasserstoff:

1. 0,1395 g geben 0,2638 g CO₂ und 0,0974 g H₂O

2. 0,1578 „ „ 0,2990 „ „ „ 0,1062 „ „

Stickstoff nach Kjeldahl:

1. 0,1543 g erfordern 18,7 ccm n/10 H₂SO₄

2. 0,1527 „ „ 18,45 „ „ „

Stickstoff nach Dumas:

1. 0,1514 g geben 22,1 ccm bei 17,5° und 758 mm Hg

2. 0,1494 „ „ 22,15 „ „ 18° „ 758 „ „

	1	2	Mittel
C	51,58	51,68	51,63
H	7,81	7,53	7,62
N (Kjeldahl)	16,97	16,91	16,94
N (Dumas)	17,01	17,08	17,05

Nasenglutein III nach Umfällen aus saurer Lösung.

Asche = 0,3%.

Kohlenwasserstoff:

1. 0,2131 g geben 0,3975 g CO₂ und 0,129 g H₂O

2. 0,2106 „ „ 0,3935 „ „ „ 0,135 „ „

¹⁾ Dieselbe Beobachtung, daß in kaltem Wasser unlösliches Glutin durch Salzsäure in eine in kaltem Wasser lösliche Modifikation übergeführt wird, habe ich auch bei Sehnenglutin gemacht (Seite 405). Andererseits gehen auch die Glutene bei längerem Stehen in Wasser in eine in kaltem Wasser lösliche Modifikation über, verhalten sich also auch in dieser Beziehung wie Sehnenglutin und — um das hier zu erwähnen — wie Handelsgelatine. Auch das Verhalten beim Erhitzen auf 135° ist für die beiden Modifikationen der Glutene dasselbe wie für die Glutene.

für die Fällung aus saurer Lösung eine größere Menge Substanz (etwa 20 g) anwenden. Auch ist es nötig, vorsichtig zu neutralisieren und im Vacuum unter 50° einzudampfen: der beim Eindampfen auf dem Wasserbad hinterbleibende Rückstand gibt die Reaktion nicht mehr¹⁾.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinen verbindlichsten Dank Herrn Prof. Thierfelder aussprechen für die Anregung, Leitung und Unterstützung bei diesen Untersuchungen.

¹⁾ Die gleiche Reaktion gab mir auch eine Substanz, welche ich bei der Darstellung von Glutin aus Sehnen mittels Kalilauge erhielt. Dieser Körper ist weiß, amorph, schmeckt stark süß, gibt keine Biuretreaktion, reduziert nicht und ist durch Bleiessig nicht fällbar.