

## Die Abbauprodukte des Elastins.

Von

**Emil Abderhalden** und **A. Schittenhelm.**

(Aus dem ersten chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. März 1904.)

Bei der hydrolytischen Spaltung des Elastins fanden sich nach Horbaczewski<sup>1)</sup> Ammoniak (0,7<sup>0</sup>/<sub>0</sub>), Leucin, (Amino-valeriansäure?), Tyrosin (0,25<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) und Glykokoll. Schwarz<sup>2)</sup> gibt 0,34<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Tyrosin an. Während es Bergh<sup>3)</sup> und Hedin<sup>4)</sup> trotz speziell darauf gerichteter Untersuchung nicht gelang, unter den Spaltungsprodukten Arginin und Lysin nachzuweisen, konnten Kossel und Kutscher<sup>5)</sup> aus Elastin das Arginin analysenrein gewinnen, und zwar 0,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Da also eine Hydrolyse mit den neuen Methoden zur Isolierung der Aminosäuren noch nicht durchgeführt ist, so lag ihre Anstellung um so näher, als in Anbetracht der Erfahrungen bei anderen Eiweißkörpern mit Sicherheit die Auffindung von Körpern vorausgesetzt werden konnte, welche nach den alten Methoden übersehen worden waren. Es war auch von Interesse, die Zusammensetzung des Elastins mit derjenigen der anderen den Albuminoiden zugeteilten Eiweißkörper zu vergleichen. Es gelang uns auch in der Tat, außer den bereits bekannten Spaltungsprodukten Leucin und Glykokoll als neue festzustellen Alanin, Phenylalanin, Glutaminsäure,  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure und Aminovaleriansäure. Asparaginsäure scheint ebenfalls vorhanden zu sein.

<sup>1)</sup> J. Horbaczewski, Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 330, 1882 und Monatshefte für Chemie, Bd. VI, S. 639, 1885.

<sup>2)</sup> H. Schwarz, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 487, 1893.

<sup>3)</sup> Ebbe Bergh, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 337, 1898.

<sup>4)</sup> S. G. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 344, 1898.

<sup>5)</sup> A. Kossel u. F. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 551, 1898.

**Experimenteller Teil.**

Zur Hydrolyse wurden 440 g Elastin benutzt, welches nach der Methode von Zollikofer<sup>1)</sup> aus dem Nackenband des Rindes gewonnen worden war. Da der Wassergehalt desselben 8,82% entsprach, so wurden demnach rund 400 g trockenes Material verwandt. Eine Veraschung von ca. 3 g ergab einen sehr geringen Aschenrückstand. Das gesamte Material wurde mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 übergossen, und zuerst in der Kälte, später auf dem Wasserbade zur klaren Lösung gebracht. Nachdem dieselbe 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht worden war, wurde sie bei 14 mm Druck zum dicken Sirup eingedampft, dann mit 1000 ccm absolutem Alkohol übergossen, und nun durch Einleitung gasförmiger Salzsäure bis zur Sättigung verestert. Zur Vervollständigung der Esterbildung wurde noch einmal im Vacuum eingedampft, mit 1½ l absolutem Alkohol übergossen und mit Salzsäure gesättigt. Als nunmehr im Vacuum wiederum ca.  $\frac{3}{4}$  l abgedampft waren, zeigte sich bereits eine reichliche Kristallisation, weshalb die Prozedur unterbrochen, und die Masse 36 Stunden auf Eis gestellt wurde. Sie war hernach zu einem dicken Kristallbrei erstarrt. Derselbe wurde mit wenig absolutem Alkohol angerührt, abgesaugt und mit wenig Alkohol nachgewaschen. Die Menge der noch gelb gefärbten, schön ausgebildeten nadelförmigen Kristalle betrug nach ihrer Trocknung über Schwefelsäure im Exsiccator 158 g. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Alkohol wurde die Substanz in glänzend weißen Nadeln gewonnen. Die Analyse ergab, daß es sich um Glykokollesterchlorhydrat handelte. Auf diese Weise waren also 85 g Glykokoll gewonnen worden.

0,1876 g Substanz gaben 0,2387 g CO<sub>2</sub> und 0,1225 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet: C 34,41 %, H 7,17 %.

Gefunden: » 34,70 %, » 7,25 %.

Das Filtrat vom Glykokollester wurde nach Einengung im Vacuum noch zweimal wie oben verestert. Trotz längeren Stehens auf Eis schied sich kein Glykokoll mehr aus. Nunmehr

<sup>1)</sup> Annal. der Chemie und Pharmaz. Bd. 82, S. 168, 1852.

wurde unter stark vermindertem Druck zum dicken Sirup verdampft, und hierauf die Ester unter Zusatz von Äther, konzentrierter Natronlauge und Kaliumkarbonat unter sorgfältiger Kühlung genau in der Weise isoliert, wie es von Fischer beim Casein<sup>1)</sup> beschrieben wurde. Das vom Äther befreite und mit Natriumsulfat getrocknete Gemisch der Ester betrug 280 g. Dasselbe wurde der fraktionierten Destillation zuerst im Wasserbad bei 14 mm, dann im Wasser- resp. Ölbad bei 0,3 mm Druck unterworfen, wobei folgende Fraktionen erhalten wurden:

1. Fraktion bis	60°	bei 14	mm Druck	9,5 g
2. »	»	100°	» 14 »	» 150,1 »
3. »	»	105°	» 0,3 »	» 30,5 »
4. »	»	180°	» 0,3 »	» 27,5 »

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen wurde in der üblichen Weise durchgeführt.

### 1. Fraktion.

Sie wurde zur Verseifung der Ester mit konz. Salzsäure eingedampft, darauf Alkohol zugegeben und gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Trotz 2tägigen Stehens auf Eis erfolgte auch nach erfolgtem Impfen nur eine geringe Abscheidung von Glykokollesterchlorhydrat.

Die Fraktion bestand im wesentlichen aus Alanin, wovon 2,3 g isoliert werden konnten.

0,1712 g Substanz gaben 0,2544 g CO<sub>2</sub> und 0,1212 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

40,45% C und 7,87% H      40,52% C und 7,87% H.

Schmelzpunkt 294° (unkorr.)

### 2. Fraktion.

Nach dem Verseifen mit der fünffachen Menge Wassers wurden die Aminosäuren durch fraktionierte Kristallisation getrennt. Da die einzelnen Fraktionen durch ihren spezifischen Geruch die Anwesenheit von  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure verrieten, so wurden sie der Reihe nach mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die weitere Verarbeitung der so erhaltenen alkoholischen Lösung ist bei der 3.-Fraktion beschrieben. Ebenso wurden

<sup>1)</sup> Emil Fischer, Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 151, 1901.

die offenbar wesentlich aus Leucin bestehenden, schwerlöslichen ersten Kristallisationen zusammen mit den aus der 3. Fraktion erhaltenen verarbeitet. Der Rest bestand aus 18 g Glykokoll und 23 g Alanin.

### 3. Fraktion.

Die Verseifung wurde ebenfalls durch Kochen mit Wasser bewirkt, und die Aminosäuren zunächst fraktioniert kristallisiert. Die einzelnen Fraktionen wurden wiederum zur Isolierung der Pyrollidinkarbonsäure mit Alkohol ausgekocht. Die vereinigten alkoholischen Auszüge der 2. und 3. Fraktion wurden im Vacuum zur Trockene eingedampft, mit 200 g Wasser aufgenommen und mit überschüssigem Kupferoxydhydrat vorsichtig gekocht. Das tiefblaue Filtrat wurde im Vacuum bei  $40^{\circ}$  zur Trockene eingedampft, die so erhaltenen Kupfersalze auf dem Wasserbad mit 100 g absolutem Alkohol gekocht, vom Unge lösten abfiltriert, und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Auf diese Weise wurden 8 g aktive Pyrollidinkarbonsäure als Kupfersalz = 3,15 g freie Säure erhalten. Die in Alkohol unlösliche Portion des Kupfersalzes, welche der racemischen Form der Pyrollidinkarbonsäure entspricht, betrug 10,3 g = 3,82 g freier Säure. Die ganze Menge wurde aus Wasser mehrmals umkristallisiert. Die Analyse des bei  $120^{\circ}$  getrockneten Kupfersalzes ergab folgende Zahlen:

0,1900 g Substanz gaben 0,2845 g $\text{CO}_2$ und 0,0927 g $\text{H}_2\text{O}$	
Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu}$	Gefunden:
41,16% C und 5,49% H	40,83% C und 5,42% H.

Die gemeinsam auf Leucin verarbeiteten Portionen der 2. und 3. Fraktion ergaben zusammen 90,5 g Rohprodukte. Die durch wiederholte fraktionierte Kristallisation von leichter löslichen Produkten getrennte Verbindung schmolz bei  $296^{\circ}$  (unkorr.) und gab folgende Zahlen:

0,1740 g Substanz gaben 0,1551 g $\text{H}_2\text{O}$ und 0,3497 g $\text{CO}_2$	
Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ :	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H	54,81% C und 9,90% H.

Die leichter löslichen Teile wurden zur vollständigen Abscheidung des Leucins in das Kupfersalz verwandelt. Durch

fraktionierte Kristallisation konnte aminovaleriansaures Kupfer, und daraus Aminovaleriansäure vom Zersetzungspunkt  $292^{\circ}$  (unkorr.) erhalten werden.

0,1833 g Substanz des Kupfersalzes gaben 0,2694 g  $\text{CO}_2$  und 0,1074 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cu}$ :	Gefunden:
40,59% C und 6,76% H	40,09% C und 6,51% H.

0,1726 g Substanz gaben 0,1426 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3223 g  $\text{CO}_2$

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ :	Gefunden:
51,28% C und 9,40% H	50,93% C und 9,18% H.

Die Menge des isolierten Leucins betrug 85,5 g. Aminovaleriansäure wurden 4,0 g erhalten. Die am leichtesten löslichen Partien dieser Fraktion ergaben 1,0 g Alanin.

#### 4. Fraktion.

Sie enthielt Phenylalanin, Glutaminsäure und wahrscheinlich kleine Mengen Asparaginsäure.

Zur Darstellung des Phenylalanins wurde das Estergemisch mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde abgedampft, der Rückstand mit rauchender Salzsäure auf dem Wasserbad verseift und ungefähr bis zu  $\frac{1}{3}$  der ursprünglichen Menge eingedampft. Beim Erkalten fielen 14,5 g Phenylalaninchlorhydrat aus: hierzu kommen noch 4,5 g durch weiteres Eindampfen der Mutterlauge. Das so isolierte Chlorhydrat (= 15,55 g freies Phenylalanin) wurde mit überschüssigem Ammoniak auf dem Wasserbade eingedampft, und das hierbei ausgefallene Phenylalanin vom Chlorammonium durch vorsichtiges Waschen mit kaltem Wasser getrennt. Zur Identifizierung wurde das isolierte Phenylalanin mit Phenylisocyanat gekuppelt. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol zersetzte sich dasselbe bei  $178^{\circ}$  (korr.) Die Analyse ergab:

0,1691 g Substanz gaben 0,4171 g  $\text{CO}_2$  und 0,0864 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$ :	Gefunden:
67,60% C und 5,63% H	67,26% C und 5,67% H.

Die nach dem Ausäthern zurückgebliebene wässrige Lösung der Ester wurde durch 2stündiges Kochen auf dem Wasserbade mit 100 g frisch gefälltem Baryumhydroxyd verseift. Nach 3tägigem Stehen wurde die vom ausgeschiedenen Baryt abfiltrierte Lösung mit Schwefelsäure quantitativ vom Baryt befreit.

und das Filtrat eingedampft. Der gelbbraune Rückstand wurde mit wenig Wasser aufgenommen, und gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach mehrtägigem Stehen schieden sich 3,8 g Glutaminsäurechlorhydrat ab ( $\equiv$  3,04 g freie Glutaminsäure), welches nach dem Umkristallisieren folgende Analysenzahlen gab:

0,1906 g Substanz gaben 0,0945 g H <sub>2</sub> O und 0,2290 g CO <sub>2</sub>	
Berechnet für C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub> Cl:	Gefunden:
32,76% C und 5,47% H	32,76% C und 5,51% H.

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrats wurde durch Kochen mit Bleioxyd von der Mineralsäure befreit, und das gelöste Blei aus dem Filtrat mit Schwefelwasserstoff entfernt. Aus der zurückbleibenden Flüssigkeit konnte ein schwerlösliches Kupfersalz gewonnen werden, dessen Menge jedoch zu einer Analyse nicht ausreichte. Wahrscheinlich lag Asparaginsäure vor.

Die Gesamtmenge der isolierten Monoaminosäuren betrug für 100 g Elastin:

	in Gramm	in Prozent
Glykokoll	103,0	25,75
Leucin	85,5	21,38
Alanin	26,3	6,58
Phenylalanin	15,55	3,89
$\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure	6,97	1,74
Glutaminsäure	3,04	0,76
Aminovaleriansäure	4,0	1,0
	in Summa	61,10

Den auffallend hohen Prozentsatz an Monoaminosäuren — die gegebenen Zahlen sind mit Ausnahme derjenigen für das Glykokoll nur Minimalzahlen — und der minimale Gehalt an Diaminosäuren — nach Kossel und Kutscher<sup>1)</sup> nur 0,3% Arginin — hat das Elastin mit dem Seidenfibroin<sup>2)</sup> gemein.

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Emil Fischer und Aladar Skita. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 177, 1901.