

# Ueber das Protamin aus den Spermatozoen der Makrele.

Von

**Dr. D. Kurajeff** aus St. Petersburg.

---

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 2. Januar 1898.)

---

In den Spermatozoen verschiedener Thiere finden sich in Verbindung mit Nucleinstoffen Eiweisskörper basischer Natur. Einige derselben besitzen eine relativ einfache Zusammensetzung, da sie, wie die Untersuchungen von A. Kossel gezeigt haben, bei der Spaltung nur wenige einfache Zersetzungsprodukte und nicht das complicirte Gemisch ergeben, welches man sonst bei der Spaltung der Eiweisskörper erhält. Diese haben den Namen Protamine empfangen. Bisher sind zwei Protamine bekannt: das von Miescher<sup>1)</sup> in den Spermatozoen des Lachses entdeckte Salmin, welches mit dem von A. Kossel<sup>2)</sup> aus dem Heringssperma isolirten Clupein identisch ist, und das von A. Kossel<sup>3)</sup> aus den Spermatozoen des Störs gewonnene Sturin. Einen Uebergang von den Protaminen zu den complicirteren Eiweissstoffen bildet das Arbacin, welches Mathews<sup>4)</sup> aus den Spermatozoen eines Seeigels (Arbacia) gewonnen hat.

Eine genaue Kenntniss dieser Gruppe einfachster Eiweiss-

1) Verhandl. d. naturforsch. Gesellschaft in Basel, Bd. VI, S. 138, 1874.

2) Sitzungsber. d. Gesellsch. zur Förderung der gesamm. Naturwissenschaften in Marburg, Juli 1897, und diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 165, 1898.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 176.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 399.

körper ist für die physiologische Chemie von grosser Bedeutung. Denn aus der Untersuchung dieser einfacheren Stoffe ergeben sich die Gesichtspunkte für die Classification und die Erkennung des Wesens der complicirteren Proteinsubstanzen. Jemehr verschiedenartige Protamine man kennt, um so grösser wird auch die Möglichkeit sein, mit Hülfe dieser Stoffe in den Bau des Eiweissmoleküls einzudringen.

Es ist demgemäss von wesentlichem Interesse, auch andere als die bisher verarbeiteten Species in der eben erwähnten Richtung zu untersuchen und, ich unternahm daher auf den Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel die Untersuchung des Spermas der Makrele (*Scomber spec.* aus der Ostsee) und stellte das darin vorhandene Protamin dar. Das Makrelensperma war aus den Testikeln dieses Fisches in der früher beschriebenen Weise gewonnen und mit Alkohol und Aether extrahirt worden. Es wurde mir von Herrn Prof. A. Kossel gütigst zur Verfügung gestellt, dem ich hier für beständige und freundliche Hülfe mit Rath und That während meiner Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen möchte.

#### Darstellung und Zusammensetzung des Protaminsulfats der Makrele.

Für die Darstellung des Protaminsulfats benutzte ich die von A. Kossel ausgearbeitete Methode.

Etwa 150 gr. der trockenen, schon früher mit Alkohol und Aether extrahirten Spermatozoenmasse wurden mit 750 ccm. einer 1%igen Schwefelsäure eine Viertelstunde geschüttelt, filtrirt: das abfiltrirte Extract wurde mit der dreifachen Menge Alkohol gefällt. Die Extraction und die Fällung wurden noch 6 mal wiederholt. Die entstandenen schwach röthlichen, klebrigen Niederschläge des Protaminsulfats wurden in wenig heissem Wasser gelöst und zur Gewinnung des Oels im Scheidetrichter über Nacht hingestellt. Das ausgefällte Oel wurde noch einmal in wenig heissem Wasser gelöst und im Scheidetrichter stehen gelassen. Das dabei ausgefällte Oel war nur schwach gelb gefärbt und die über dem Oel stehende Flüssigkeit war fast farblos.

Das von der Flüssigkeit abgetrennte Oel wurde in etwa 1500 ccm. Wasser gelöst und die Lösung mit Natriumpikrat niedergefällt. Der mehrmals mit Wasser ausgewaschene Niederschlag des Protaminpikrats<sup>1)</sup> wurde im Scheidetrichter mit verdünnter Schwefelsäure und Aether geschüttelt, bis die ganze Pikrinsäure entfernt war. Die auf diese Weise erhaltene schwefelsaure Lösung des Protaminsulfats wurde wieder mit Natriumpikrat gefällt und in der eben beschriebenen Weise nochmals in das Sulfat übergeführt. Zuletzt wurde die schwefelsaure Lösung des Protaminsulfats mit dem dreifachen Volumen 95%igen Alkohols gefällt. Die ausgeschiedene, klebrige Masse wurde in wenig heissem Wasser gelöst und die Alkoholfällung wiederholt. Dabei schied sich ein schneeweisser, flockiger Niederschlag des Protaminsulfats aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mehrmals mit Alkohol und Aether ausgewaschen und zuerst über Schwefelsäure, darauf im Trockenschrank bei 110—115° getrocknet. Ich will dieses Sulfat vorläufig seiner Herkunft nach als «Scombrinsulfat» bezeichnen.

Die Elementaranalyse gab folgendes Resultat:

1. 0,2910 gr. Substanz gaben	0,1430 gr. BaSO <sub>4</sub> .
2. 0,3365	0,1638 » BaSO <sub>4</sub> .
3. 0,2674	0,3777 » CO <sub>2</sub> und 0,1695 gr. H <sub>2</sub> O.
4. 0,1898	0,2644 » CO <sub>2</sub> » 0,1185 » H <sub>2</sub> O.
5. 0,2850	60,2 ccm. N <sub>2</sub> bei 14° und 742 mm. Bar.
6. 0,2020	42,1 » N <sub>2</sub> » 14° » 752 » Bar.
7. 0,2074	43,5 » N <sub>2</sub> » 15° » 746 » Bar.

	Im Mittel		
C	38,52	37,99	38,25
H	7,04	6,93	6,98
N	24,24	24,26	24,09
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,65	20,47	20,56

Die gefundenen Analysenzahlen für das Scombrinsulfat stimmen am besten mit der Formel C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>N<sub>16</sub>O<sub>6</sub>2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> überein.

1) Es sei bemerkt, dass das Protaminpikrat möglichst bald in das Sulfat übergeführt werden muss; sonst ist es schwer, eine ganz farblose Lösung des Protaminsulfats aus dem Pikrat zu erhalten.

Berechnet für	Gefunden
$C_{30}H_{60}N_{16}O_6 \cdot 2H_2SO_4$	im Mittel
C 38.46	38.25
H 6.83	6.98
N 23.93	24.20
O 23.93	23.87
S 6.83	6.70

Das Verhältniss C : N ist in den gefundenen Zahlen 1,844.

### Eigenschaften des Scombrinsulfats.

Das Scombrinsulfat, welches sich in trockenem Zustande als ein weisses, in heissem Wasser leicht lösliches Pulver darstellt, röthet ziemlich stark das blaue Lackmuspapier, wie dies auch beim Clupeinsulfat der Fall ist. Bei der Abkühlung der heissen, concentrirten, wässerigen Lösung scheidet sich das Scombrinsulfat in Form eines schwach gelb gefärbten Oeles aus. Das Scombrinsulfat gibt eine schöne blau-violette Biuret-reaction, dagegen keine Millon- und Molisch'sche Reaction. Gesättigte Lösung von  $(NH_4)_2SO_4$  und NaCl ruft eine Fällung des Scombrinsulfats aus seiner wässerigen Lösung hervor. Die Versuche, das Scombrinsulfat aus seiner wässerigen Lösung durch Aussalzung mit  $(NH_4)_2SO_4$  in krystallisirtem Zustande zu erhalten, gaben negatives Resultat.

Beim Verbrennen gibt das Scombrinsulfat einen eigenthümlichen Geruch und hinterlässt keine Asche. Die Lösung von Scombrinsulfat gibt Niederschläge mit Natriumpikrat, Kaliumchromat, Ferrocyankalium, Quecksilberchlorid und Jodjodkalium.

Es war von grossem Interesse, die physikalischen Eigenschaften des Scombrinsulfats im Vergleich mit denen des Clupeinsulfats gleichzeitig und unter denselben Bedingungen zu studiren. Deshalb untersuchte ich die Löslichkeit beider Protaminsulfate im Wasser, die Einwirkung ihrer gesättigten wässerigen Lösungen auf das polarisirte Licht und den Brechungscoefficienten des Oels beider Protaminsulfate.<sup>1)</sup>

1) Das Clupeinsulfat war mir von Prof. A. Kossel gütigst geliefert; es war im Allgemeinen nach demselben Verfahren dargestellt; ich habe es nur einmal im Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt.

Die concentrirten, warmen wässerigen Lösungen beider Protaminsulfate wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dabei schied sich ein Theil der Protaminsulfate in Form von Oel aus. In den über dem Oel stehenden Lösungen wurde der Stickstoff nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmt.

Das Resultat war folgendes:

	Scobrinsulfat	Clupeinsulfat
N-Gehalt in 100 cem. der gesättigten Lösung:	0,5268	0,4088

Daraus berechneter Gehalt an:

Scobrinsulfat $C_{30}H_{61}N_{16}O_6 \cdot 2H_2SO_4$ und	} 2,20%	1,62%
Clupeinsulfat $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 2H_2SO_4$		

Wenn man annehmen wollte, dass das Scobrinsulfat dieselbe Zusammensetzung wie das Clupeinsulfat hat, und aus dem Stickstoffgehalt den Gehalt an Protamin berechnen würde, so würde sich seine Löslichkeit = 2,09% ergeben.

Das Drehungsvermögen der gesättigten Lösung beider Protaminsulfate wurde im 20 cm. langen Rohr bestimmt und als Drehungswinkel ergab sich folgender:

Scobrinsulfat	Clupeinsulfat
— 3,16°	— 2,77°.

Demnach ist das spezifische Drehungsvermögen für das Scobrinsulfat ( $C_{30}H_{61}N_{16}O_6 \cdot 2H_2SO_4$ ) und das Clupeinsulfat ( $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 2H_2SO_4$ ), nach der Formel  $(\alpha)_D = \frac{[\alpha]}{p \cdot l}$  berechnet, folgendes:

Scobrinsulfat	Clupeinsulfat
$(\alpha)_D = - 71,81$	— 85,49.

Der Brechungscoefficient des aus der gesättigten Lösung abgeschiedenen wasserhaltigen Oels des Scobrinsulfats und Clupeinsulfats wurde mittelst des Refraktometers von Pulfrich bestimmt und war folgender:

Scobrinsulfat	Clupeinsulfat
1,436	1,439.

Nach den vorliegenden Bestimmungen ergeben sich gewisse Unterschiede zwischen dem Scobrin und dem Clupein. Bei der Beurtheilung derselben ist zu berücksichtigen, dass die bisher beim Clupein und Salmin gewonnenen Zahlen

A. Kossel's (l. c.) von den meinigen etwas abweichen. A. Kossel fand die Löslichkeit des Clupeinsulfats zu 1,29% (bei Annahme der Formel  $C_{36}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 2H_2SO_4$  aus dem Stickstoffgehalt berechnet). Für das spezifische Drehungsvermögen berechnet sich aus seinen Befunden für Clupeinsulfat  $\alpha_D = -83,07$ , für das Brechungsvermögen des Oels 1,443. Diese Unterschiede müssen auf verschiedene Umstände zurückgeführt werden. Zunächst ist, da es sich nur um Vergleichung zweier unter denselben Bedingungen untersuchter Präparate handelte, auf die Temperaturverhältnisse, die bei beiden Präparaten die gleichen waren, nicht Rücksicht genommen, diese können aber bei beiden Beobachtern sehr verschieden gewesen sein. Ferner hat schon A. Kossel auf die Schwierigkeiten hingewiesen, welche aus der Neigung der Protamine zur Bildung saurer Salze erwachsen. Je saurer die Reaction der Flüssigkeit, um so grösser ist die Löslichkeit.

#### Darstellung und Zusammensetzung des Scombrinchromats und des Clupeinchromats.

Da die Protaminsalze der Reinigung und der chemischen Analyse manche Schwierigkeiten bereiten, so sind die Formeln dieser Körper trotz der mühevollen Untersuchungen doch noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Es wäre sowohl für Sicherstellung der Formeln, wie auch für die Vergleichung der verschiedenen Protamine unter einander von Werth, mehrere Salze desselben zu untersuchen und zwar, wenn möglich, solche, die in Wasser unlöslich sind.

Für diesen Zweck schien das chromsaure Salz geeignet zu sein und ich habe mich daher bemüht, dasselbe darzustellen und zu analysiren.

#### Das Scombrinchromat.

Eine kleine Menge (ca. 3,0) des Scombrinsulfats wurde in viel Wasser (ca. 500 cem.) gelöst und mit Kaliumchromat gefällt: dabei schied sich zuerst ein gelber pulveriger Niederschlag aus, der sich bald in eine kleberige, an den Wänden der Porzellanschale haftende Masse umwandelte. Nach einigen

Stunden war die Flüssigkeit fast ganz klar geworden und wurde von der kleberigen Masse abgossen: der Niederschlag wurde vielmal mit Wasser ausgewaschen, bis keine Schwefelsäure im Waschwasser nachgewiesen werden konnte. In kaltem Wasser löste sich das Chromat nur spurenweise. Beim Austrocknen an der Luft wandelte sich der gelbe, kleberige Niederschlag des Scombrinchromats in eine gelbe durchsichtige Masse um, die man leicht von den Wänden der Porzellanschale abtrennen konnte: Ausgetrocknet und zerrieben stellte sich das Scombrinchromat als ein grünlichgelbes Pulver vor. Beim Schmelzen mit Soda und Salpeter u. s. w. waren nur ganz geringe Spuren von Schwefel nachzuweisen. Das Scombrinsulfat färbte rothes Lackmuspapier blau, wenn es in feuchtem Zustand gegen dasselbe gedrückt wurde.

Die Analyse des bei 110—115° ausgetrockneten Scombrinchromats gab folgende Resultate:

1.	0,2190 gr. Substanz gaben	0,0338 gr. $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .
2.	0,1754	0,0270 $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .
3.	0,2404	0,3306 $\text{CO}_2$ und 0,1444 gr. $\text{H}_2\text{O}$ .
4.	0,2280	0,3110 $\text{CO}_2$ » 0,1376 » $\text{H}_2\text{O}$ .
5.	0,1880	38,5 cem. $\text{N}_2$ bei 15° u. 756 mm. Bar.
6.	0,2386	48,6 $\text{N}_2$ » 13,5° » 754 » Bar.

	Im Mittel		
C	37,50	37,20	37,35
H	6,67	6,75	6,71
N	23,85	23,81	23,83
Cr	10,54	10,53	10,53

Die gefundenen Analysenzahlen lassen sich in folgender Formel ausdrücken:  $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_{16}\text{O}_5\text{2H}_2\text{CrO}_4$ .

Berechnet für	Gefunden	
$\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_{16}\text{O}_5\text{2H}_2\text{CrO}_4$	im Mittel	
C 37,57	37,35	
H 6,47	6,71	
N 23,38	23,83	C : N $\cong$ 1,828
O 21,71	21,58	
Cr 10,85	10,53	

Das Clupeinchromat wurde nach demselben Verfahren.

wie auch das Scombrinchromat, dargestellt, d. h. zuerst wurde das Clupeinsulfat aus den Spermatozoen des Herings in reinem Zustande gewonnen und dann in das chromsaure Salz übergeführt. Leider gelang die Ausscheidung des Chromats in diesem Fall nicht so gut, wie bei dem Scombrin; denn das Clupeinchromat enthielt nach dem Auswaschen mit Wasser eine nicht unbeträchtliche Menge von Schwefel. Zur Reinigung wurde es in viel Wasser auf kochendem Wasserbade gelöst; die Lösung ging nur sehr langsam und unvollständig vor sich: es blieb dabei ein kleiner Theil<sup>1)</sup> der Substanz ungelöst zurück. Die heisse alkalisch reagirende Lösung von Clupeinchromat blieb bei der Zimmertemperatur stehen. Nach dem zweitägigen Stehen sammelte sich am Boden des Gefäßes (der Porzellschale) ein gelber, kleberiger Niederschlag des Clupeinchromats an. Die über dem Niederschlag stehende trübe Flüssigkeit wurde abgossen und der Niederschlag mit Wasser vielmal ausgewaschen. Beim Stehen und Trocknen wandelte er sich in eine grünlichgelbe, durchsichtige, lackartige Masse um. Trotz dieses Reinigungsversuchs enthielt das Präparat immer noch merkliche Spuren von Schwefel, die aber, wie es schien, die Analysenresultate nicht merklich beeinflussten, denn der Stickstoffgehalt dieses Präparats stimmte mit der von A. Kossel angenommenen Formel nahe überein. Jedenfalls ist der Stickstoffgehalt auch dieses Salzes wieder höher als der des entsprechenden Scombrinsalzes.

	Clupeinchromat			Berechnet für $C_{30}H_{55}N_{17}O_5 \cdot 2H_2CrO_4$
	Gefunden			
	I	II	Mittel	
N (vol.)	24,83	24,61	24,72	24,56

### Spaltung des Scombrinsulfats.

Um die Vergleichung des Scombrins mit den anderen schon untersuchten Protaminen weiter zu führen und etwa

<sup>1)</sup> In diesem Rest vom Clupeinchromat habe ich den Chromgehalt zu 17,68% gefunden; es scheint hiernach, als ob beim Kochen des Clupeinchromats ein kleiner Theil desselben sich in das bichromsaure Salz  $C_{30}H_{55}N_{17}O_5 \cdot 2H_2Cr_2O_4$  umgewandelt hat, das nach der Berechnung 17,79% Chrom enthalten muss.

neue Anhaltspunkte für die Beurtheilung des Scombrins zu erhalten, verwandte ich eine kleine Menge (ca. 0,5 gr.) des übrig gebliebenen Sulfats zur Spaltung mit Schwefelsäure. Für diesen Zweck benutzte ich die von Prof. A. Kossel<sup>1)</sup> angegebene Methode. Das Scombrinsulfat wurde in wenig Wasser gelöst, zur Lösung wurde soviel Schwefelsäure hinzugefügt, dass der Gehalt derselben 33% betrug.

Die Mischung wurde 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht, darauf mit Wasser genau bis 250 cem. verdünnt. Von dieser Lösung habe ich 50 cem. für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl abgemessen. Die übrig gebliebenen 200 cem. Flüssigkeit wurden mit Silbersulfat und Baryt gefällt und der abgeschiedene Niederschlag sorgfältig abgesaugt, mit Barytwasser zerrieben, wieder abgesaugt und das Auswaschen mehrfach wiederholt. Durch die vereinigten, mit Schwefelsäure angesäuerten Filtrate wurde Schwefelwasserstoff hindurchgeleitet, vom Niederschlag abfiltrirt, ausgewaschen und im eingedampften Filtrat der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der Niederschlag, welcher die Silberverbindungen des Arginins und Histidins enthalten musste, wurde mit Schwefelsäure angesäuert und durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit: der entstandene Niederschlag von Schwefelsilber und Baryumsulfat wurde abgesaugt, mit Wasser unter Durchleiten von Schwefelwasserstoff gekocht, wieder abgesaugt und der Niederschlag sorgfältig ausgewaschen. In der Hälfte des eingedampften Filtrats wurde der Stickstoffgehalt nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmt. Die erhaltenen Resultate sind die folgenden:

1. In 50 cem. von 250 cem. Flüssigkeit, welche die Zersetzungsprodukte des Scombrins enthielt, wurde 0,02170 gr. N gefunden, demnach betrug die Gesamtmenge des Stickstoffs (in 250 cem.) 0,1085 gr.
2. Die Hälfte des Silberniederschlages enthielt 0,03318 gr. N, demnach enthielt der ganze Niederschlag (aus 200 cem.) 0,06636 gr. N.
3. Im Filtrat vom Silberniederschlag wurde 0,021070 gr. N gefunden.

Wenn man die gefundenen Zahlen in Procent des Gesamtstickstoffs ausdrückt, so bekommt man folgendes Resultat:

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 165.

Stickstoff des Silberniederschlags . . . . .	76,45°
Stickstoff des Filtrats . . . . .	24,27°
	100,72°

In beifolgender Tabelle stelle ich die von A. Kossel bei der Untersuchung von Salmiin, Clupein und Sturin gewonnenen Resultate den meinigen gegenüber:

	Salmiin	Clupein		Sturin		Scombrin
Stickstoff des Silberniederschlags.	82,9	85,6	—	76,8	77,8	76,45
Stickstoff des Filtrates.	13,6	11,0	11,6	17,7	19,3	24,27

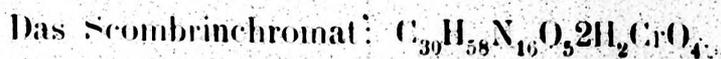
Hiernach scheint sich das Scombrin auch bezüglich der quantitativen Verhältnisse seiner Componenten vom Clupein zu unterscheiden, während es sich dem Sturin nähert, mit dem es im Uebrigen eine geringe Aehnlichkeit besitzt.

#### Zusammenfassung der Hauptresultate.

1. In den Spermatozoen der Makrele ist eine Substanz enthalten, welche die allgemeinen Eigenschaften der Protamine besitzt.

2. Die einfachste elementare Formel für das Protaminsulfat der Makrele ist:  $C_{30}H_{60}N_{16}O_6 \cdot 2H_2SO_4$ . Demnach unterscheidet sich das Protaminsulfat der Makrele vom Clupein- und Salmiumsulfat dadurch, dass es mehr Wasserstoff und weniger Stickstoff besitzt: die einfachste elementare Formel für das Clupein- und Salmiumsulfat nach den Angaben von Prof. A. Kossel (l. c.) ist:  $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 2H_2SO_4$ .

3. Die chromsauren Salze des Protamins der Makrele und des Herings entsprechen den Sulfaten beider Protamine, nur enthalten die Chromate je ein Molekül  $H_2O$  weniger als die entsprechenden Sulfate:



Das Verhältniss C: N im Scombrinsulfat ist dasselbe wie im Chromat, nämlich in ersterem Salze 1,844, im letzteren 1,828.

4. Das Scombrinsulfat zeigt in Bezug auf seine Löslichkeit in Wasser und sein optisches Drehungsvermögen geringe, aber sicher festzustellende Unterschiede von dem Clupeinsulfat. Die Unterschiede im Lichtbrechungsvermögen des aus wässriger Lösung ausgeschiedenen Oels fallen in den Bereich der Fehlergrenzen.

5. Bei der Zersetzung des Scombrins durch siedende Schwefelsäure wird weniger Stickstoff in Form von Arginin und Histidin abgespalten, als bei der entsprechenden Zerlegung des Clupeins und ungefähr ebenso viel wie bei der Zersetzung des Sturins.

6. Aus allen angeführten Thatsachen ergibt sich, dass das Scombrin ein besonderer, wenn auch den bisher bekannten Protaminen sehr nahe stehender Körper ist. Besonders ist es in seiner Zusammensetzung und seinen Eigenschaften dem Clupein oder Salmin sehr ähnlich.