

Ueber die Protamine.

Von
Dr. M. Goto.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)
(Der Redaction zugegangen am 3. November 1902.)

Durch die Untersuchungen von A. Kossel sind die Protamine als die einfachsten Körper der Eiweissgruppe charakterisirt worden. Es ist bisher keine Substanz bekannt, welche so wenige einfach gebaute Spaltungsproducte liefert wie Salmin, Clupein und Sturin, und welche doch die Eigenschaften und Reactionen der Eiweisskörper gibt. Die Erkenntniss ihrer chemischen Natur hat dadurch ein principiell Interesse gewonnen, denn man wird aus ihrer Untersuchung wichtige Gesichtspunkte für die Betrachtung der complicirten Eiweisssubstanzen ableiten können. Ich bin daher der Aufforderung des Herrn Professor Dr. A. Kossel zur Fortsetzung seiner früheren Untersuchungen über die Protamine gerne gefolgt.

Das erste Ziel meiner Untersuchungen musste naturgemäss die Gewinnung reiner chemischer Individuen sein, aber gerade diese Bestrebungen stossen auf grosse Schwierigkeiten. In einzelnen Fällen gelingt es zwar, leicht zu Producten constanter Zusammensetzung zu kommen, bei Protaminen anderen Ursprungs bleibt jedoch eine Unsicherheit über die chemische Individualität bestehen. An die Versuche zur Reindarstellung schlossen sich die Analysen und besonders das Studium der ersten Umwandlungsproducte: der Protone. Die Entstehung dieser von A. Kossel aufgefundenen den Protaminen nahestehenden Producte bildet nächst der Biuretreaction das wichtigste Beweismittel für die Analogie der Protamine mit den Eiweisskörpern. Ebenso wie die letzteren werden auch die Protamine durch Einwirkung von Säuren und durch proteolytische Fermente (Trypsin, Erepsin) peptonisirt und hierbei entstehen die Protone. Ich habe mich bemüht, einige Anhaltspunkte für die Erkenntniss der Natur dieses Vorganges zu

gewinnen, indem ich die procentische Zusammensetzung der Protone mit der der Protamine verglich.

Bekanntlich haben die Arbeiten von A. Kossel gezeigt, dass wir in den Protaminen eine chemische Gruppe von grosser Mannigfaltigkeit vor uns haben. Ich bin, um die wesentlichsten Merkmale der Protamingruppe besser zu erkennen, nicht bei der Untersuchung eines einzelnen Protamins stehen geblieben, sondern habe mehrere Repräsentanten dieser eigenthümlichen Körperklasse in das Bereich meiner Untersuchungen einbegriffen, und zwar verarbeitete ich die Protamine aus den Spermatozoen von Lachs, Hering, Makrele und Stör.

A. Ueber die procentische Zusammensetzung einiger Protamine.

I. Salmin.

Das Protamin in den Lachstestikeln ist von F. Miescher entdeckt und seitdem mehrfach analysirt worden.¹⁾ Miescher, Piccard²⁾ und Cloetta³⁾ untersuchten das Platindoppelsalz, Kossel⁴⁾ das Sulfat.

Die Analysen Piccard's und Cloetta's sowie ein Theil der Analysen Miescher's stehen mit den Analysen des Sulfats in befriedigender Uebereinstimmung. Unzweifelhaft bietet das Platindoppelsalz grosse Vortheile für die Darstellung und Untersuchung, da es leichter mit constantem Wassergehalt darzustellen ist und besser verbrennt. Doch haftet seiner von Miescher angegebenen Darstellung durch Ausfällung aus wässriger Lösung der grosse Uebelstand an, dass der Niederschlag zunächst harzig ausfällt. Miescher liess ihn ein paar Wochen unter der Lösung stehen, um eine für die weitere Bearbeitung geeignete Beschaffenheit anzunehmen, Piccard suchte dasselbe durch Anwendung eines Ueberschusses von Platinchlorid zu erreichen. Viel leichter gelangt man jedoch

1) Verhandlungen der naturforsch. Ges. in Basel, Bd. 6, S. 138 bis 208, 1874.

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 7 (1874), S. 1714.

3) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. 37.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 179; Bd. XXV, S. 165.

zu einem für die Analyse geeigneten Präparat, wenn man sich bei der Ausfällung mit Platinchlorid aus der alkoholischen Lösung des Protaminchlorhydrats bedient. Dies Verfahren wurde mir von Herrn Professor A. Kossel, welcher es bereits erprobt hatte, vorgeschlagen, und ich habe es auch bei meinen Untersuchungen über die übrigen Protamine und der Protone stets benutzt. Die Darstellungsweise gestaltete sich hierdurch folgendermaassen: Zunächst stellte ich nach dem früher von A. Kossel beschriebenen Verfahren das Protaminsulfat dar.¹⁾ Dieses löste ich in Wasser und fügte vorsichtig Baryumchlorid hinzu, bis zur vollständigen Ausfällung der Schwefelsäure; ein Ueberschuss von Baryumchlorid muss vermieden werden. Die Lösung, welche auch keine überschüssige anorganische Säure enthalten darf, wird jetzt auf dem Wasserbad eingedampft und unter Zusatz einiger Tropfen concentrirter Salzsäure in Methylalkohol gelöst. Die methylalkoholische Lösung von Protaminchlorhydrat wird jetzt mit Aether gefällt, der Niederschlag mit Methylalkohol gelöst, nochmals gefällt und die Fällung dreimal wiederholt. Das in viel wasserfreiem Methylalkohol gelöste Chlorhydrat wird mit frisch bereiteter, möglichst wasserfreier methylalkoholischer verdünnter Lösung von Platinchlorid gefällt. Während des Zusatzes der Platinchloridlösung rührt man mit einem Glasstäbchen um. Der Niederschlag hat dann eine fein pulverige Beschaffenheit, man decantirt die Flüssigkeit, wenn möglich, bringt von Neuem verdünnte methylalkoholische Lösung von Platinchlorid hinzu, lässt einen Tag stehen, filtrirt mit Hilfe der Saugpumpe, wäscht mit Methylalkohol, sodann mit Aether und bringt den gewaschenen Niederschlag unverzüglich in den Exsiccator.

Zur Analyse trocknete ich sodann die Substanz im Vacuum bei 110° bis zum constanten Gewicht. Die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen führte ich mit Kupferoxyd und bei vorgelegter Kupfer- und Silberspirale aus, die Stickstoffbestimmungen volumetrisch. Zur Chlorbestimmung zerstörte ich die Substanz durch Verbrennung mit der Salpetersodamischung.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 166.

Die Resultate waren folgende:

Präparat I.

0.1852 g gaben 0.1570 CO₂ = 23.11% C und 0.0726 H₂O = 4.35% H.
 0.2130 „ „ 0.1786 CO₂ = 22.86% C „ 0.0827 H₂O = 4.31% H.
 0.2116 g gaben 28,0 ccm N bei 20° C. und 745 mm B. = 14,84% N.
 0.1156 „ „ 14,8 „ N „ 13,5° C. „ 742,5 „ B. = 14,74% N.
 0,2440 g gaben 0,0604 g Pt = 24,75% Pt.
 0,1033 „ „ 0,0255 „ Pt = 24,68% Pt.
 0,2370 g gaben 0,2530 g AgCl = 26,40% Cl.
 0,3163 „ „ 0,3430 „ AgCl = 26,81% Cl.

Präparat II.

0.1675 g gaben 0.1415 g CO₂ = 23.03% C und 0.0695 g H₂O = 4.61% H.
 0.1825 „ „ 0.1529 „ CO₂ = 22.85% C „ 0.0660 „ H₂O = 4.01% H.
 0.1354 g gaben 17,1 ccm N bei 11° C. und 747 mm B. = 14,79% N.
 0.1430 „ „ 18,3 „ N „ 12° C. „ 748 „ B. = 14,94% N.
 0,1106 g gaben 0,0274 g Pt = 24,77% Pt.
 0,1320 g gaben 0,1420 g AgCl = 26,55% Cl.
 0,1620 „ „ 0,1735 „ AgCl = 26,49% Cl.

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Zahlen zusammengestellt und zum Vergleich die von Piccard und von Cloetta gefundenen hinzugefügt.

Zusammenstellung der Resultate.

	Präparat I		Präparat II		Mittel	Von Piccard gefundene Zahl ¹⁾			Die Zahlen, welche Cloetta in Miescher's hinter- lassenen Präparaten fand ²⁾		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
C	23.11	22.86	23.03	22.85	22.96	22.80	—	22.78	—	—	—
H	4.35	4.31	(4.61)	4.01	4.22	4.15	—	4.40	—	—	—
N	14.84	14.74	14.79	14.94	14.83	—	15.03	—	—	—	—
Pt	24.75	24.68	24.77	—	24.73	—	24.64	—	24.65	24.74	24.36
Cl	26.40	26.81	26.55	26.49	26.56	—	26.45	—	26.35	—	26.97

1) Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, Bd. VII, S. 17—18.

2) Archiv für experiment. Pathologie und Pharmakologie, Bd. 37: Miescher, Histochemische und physiologische Arbeiten, II, S. 366.

Die Analysen Miescher's ergaben einen etwas höheren Kohlenstoffwerth, wie die von A. Kossel gegebene Zusammenstellung¹⁾ erkennen lässt.

In Anbetracht der Grösse des Moleküls lässt sich aus diesen Analysen noch nicht mit Sicherheit eine Formel berechnen. Die von Schmiedeberg angenommene Formel $C_{16}H_{28}N_9O_2 \cdot 2HCl + PtCl_4$ ²⁾ würde ebenso wie die ursprüngliche Formel Miescher's $C_{16}H_{30}N_9O_3 \cdot 2HCl + PtCl_4 + \frac{1}{2}H_2O$ beträchtliche Abweichungen im C-, N- und zum Theil auch im Pt-Gehalt zeigen, besser stimmt die Formel $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 4HCl + 2PtCl_4$, welche A. Kossel aufgestellt hat, indem er die Analysen des Sulfats zu Grunde legte. Das Sulfat entsprach der Formel $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 + 2H_2SO_4 + H_2O$.

	$C_{32}H_{50}N_{15}O_6 \cdot 4HCl + 2PtCl_4 + H_2O$ (Miescher)	$C_{32}H_{56}N_{18}O_4 \cdot 4HCl + 2PtCl_4$ (Schmiedeberg)	$C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 4HCl + 2PtCl_4$ (Kossel)	Gefunden im Mittel	
				Piccard	Goto
C	23.55	24.36	22.91	22.79	22.96
H	4.05	3.84	3.92	4.37	4.22
N	15.46	16.03	15.18	15.03	14.83
Pt	23.96	24.72	24.78	24.64	24.73
Cl	26.13	26.98	27.05	26.45	26.56

Selbstverständlich können die Formeln nur zur vorläufigen Orientirung dienen und als bequemster Ausdruck der Analyseergebnisse betrachtet werden, ein Aufschluss über die Grösse des Moleküls wird erst späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die genaue Uebereinstimmung meiner Analysenzahlen mit denjenigen, welche Piccard bei einem in anderer Weise dargestellten Präparat erhalten hat, spricht mit grosser Wahr-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 172.

2) Die Formeln Miescher's und Schmiedeberg's sind aus nahelegenden theoretischen Gründen als einfache Formeln nicht denkbar, wie schon A. Kossel hervorgehoben hat, sie müssen also mindestens verdoppelt werden, wie dies in der folgenden Zusammenstellung geschehen ist.

scheinlichkeit für die chemische Individualität unseres Salmins. Bisher ist es auch nicht möglich gewesen, irgend eine Reaction ausfindig zu machen, welche auf eine Zusammensetzung des Salmins aus mehreren ungleichartigen Körpern schliessen lässt, speciell hat die neuerdings mehrfach benutzte fractionirte Fällung mit Salzlösungen nicht zu einer Trennung in mehrere Individuen geführt.

Fügt man zu einer 2^o igeu Lösung von Salminsulfat eine gesättigte Ammonsulfatlösung hinzu, so bemerkt man den Beginn einer Trübung, wenn in 10 cem Lösung 5.5 cem gesättigter Salzlösung 2.5 cem Wasser und 2.0 cem Salminsulfatlösung vorhanden sind. Die Fällung ist vollendet bei Zusatz von 7.5 cem gesättigter Salzlösung auf 10 cem Lösung.

II. Clupein.

Das Clupeinplatinchlorid wurde aus reifen Heringstestikeln ebenso dargestellt, wie das Salminplatinchlorid aus den Testikeln des Lachses.

Der so gewonnene Körper ist als Präparat I bezeichnet. Um die chemische Individualität meines Productes zu prüfen, untersuchte ich das Sulfat mit Hülfe der fractionirten Salzfällung.¹⁾ Diese Prüfung ergab keinen Hinweis auf das Vorhandensein einer Beimischung. Ich begnügte mich hiermit jedoch nicht, sondern stellte noch ein zweites Präparat des Protaminplatinchlorids dar, indem ich das Chlorid der Dialyse unterwarf und den zunächst durch die Membran hindurchdialysirten Antheil des Salzes im Vacuum auf eine kleine Quantität eindunstete²⁾ und nach Zusatz eines Tropfens con-

1) Die Prüfung wurde ausgeführt, indem die beim Erkalten der heissen wässerigen Lösung zuerst abgeschiedene Fraction des Clupeinsulfats, welche bei der Darstellung nach A Kossel verworfen wird, hinsichtlich ihrer Fällbarkeit durch Ammonsulfat mit der Fraction mittlerer Löslichkeit, welche zu den Darstellungen dient, verglichen wurde. Beide zeigten bei Anwendung von 2 cem einer 2^o igeu Lösung des Clupeinsulfats das gleiche Verhalten: es trat eine Opalescenz nach längerem Stehen ein, wenn die Menge der gesättigten Salzlösung 2.5 cem in 10 cem betrug, die Fällung war vollendet, wenn in 10 cem 7.5 cem Salzlösung vorhanden waren.

2) Clupeinchlorhydrat diffundirt durch Pergamentpapier. Clupein-

centrirter Salzsäure in Methylalkohol löste. Die Lösung wurde mit Aether gefällt und wie oben behandelt. Die Analyseergebnisse waren die gleichen wie oben, wenn man von einer ca. 0,43% betragenden Differenz im Mittel des Kohlenstoffgehalts absieht, die den Fehlergrenzen sehr nahe liegt. Also auch auf diesem Wege liess sich keine Thatsache ausfindig machen, welche einen Zweifel an der Einheitlichkeit meiner Substanz begründete. Die Ergebnisse der Analysen waren folgende:

Präparat I.

0,1832 g	gaben	0,1552 g	CO ₂	=	23,10%	C	und	0,0715 g	H ₂ O	=	4,34%	H.		
0,1310	»	0,1106	»	CO ₂	=	23,03%	C	»	0,0506	»	H ₂ O	=	4,28%	H.
0,1764	»	0,1476	»	CO ₂	=	22,82%	C	»	0,0692	»	H ₂ O	=	4,35%	H.
0,1374 g	gaben	14,5	ccm	N	bei	11°	C.	und	754	mm	B.	=	12,48%	N.
0,1618	»	17,0	»	N	»	11,5°	C.	»	755	»	B.	=	12,41%	N.
0,1276 g	gaben	0,0315	g	Pt	=	24,68%	Pt.							
0,1518	»	0,0376	»	Pt	=	24,76%	Pt.							
0,1320 g	gaben	0,1416	g	AgCl	=	26,52%	Cl.							
0,1294	»	0,1386	»	AgCl	=	26,48%	Cl.							
0,1366	»	0,1476	»	AgCl	=	26,71%	Cl.							

Präparat II.

0,3790 g	gaben	0,3136	g	CO ₂	=	22,57%	C	und	0,1438	g	H ₂ O	=	4,22%	H.
0,2278	»	0,1882	»	CO ₂	=	22,53%	C	»	0,0884	»	H ₂ O	=	4,31%	H.
0,2235 g	gaben	25,2	ccm	N	bei	13°	C.	und	732	mm	B.	=	12,83%	N.
0,1372	»	15,2	»	N	»	12°	C.	»	730	»	B.	=	12,62%	N.
0,1638	»	17,5	»	N	»	9,5°	C.	»	750	»	B.	=	12,65%	N.
0,2262 g	gaben	0,0557	g	Pt	=	24,62%	Pt.							
0,1868	»	0,0458	»	Pt	=	24,52%	Pt.							
0,1582 g	gaben	0,1694	g	AgCl	=	26,47%	Cl.							
0,1735	»	0,1873	»	AgCl	=	26,69%	Cl.							

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Zahlen zusammengestellt.

sulfat hingegen nicht. Ich bediente mich bei meinen Versuchen der Pergamentpapierhülsen, wie sie von Schleicher und Schüll für den Extractionsapparat geliefert wurden (Grösse 100 × 35 mm). In die Hülsen brachte ich die Protaminlösung, hängte sie in ein Becherglas mit Wasser und erhitze letzteres auf dem Wasserbade auf 40—45° C.

	Präparat I			Präparat II (zuerst diffundirender Antheil)			Mittel
	„	„	„	„	„	„	
C	23.10	23.03	22.82	22.57	22.53	—	22.81
H	4.34	4.28	4.35	4.22	4.31	—	4.30
N	12.48	12.41	—	12.83	12.62	12.65	12.59
Pt	24.68	24.76	—	24.62	24.52	—	24.64
Cl	26.52	26.48	26.71	26.47	26.69	—	26.57

Als einfacher Ausdruck dieser Analysenzahlen kann die Formel $C_{30}H_{62}N_{14}O_9$ gelten.

	Berechnet für $C_{30}H_{62}N_{14}O_9 \cdot 4HCl + 2PtCl_4$	Gefunden (Mittel)
C	22.75 %	22.81 %
H	4.21 %	4.30 %
N	12.42 %	12.59 %
Pt	24.62 %	24.64 %
Cl	26.88 %	26.57 %
O	9.10 %	(9.09 %)

Der Stickstoffgehalt weicht von dem des entsprechenden Salminsalzes ab. A. Kossel fand bei den vergleichenden Analysen des Salmin- und Clupeinsulfats Zahlen, welche den Formeln $C_{30}H_{59}N_{17}O_7 + 2H_2SO_4$ und $C_{30}H_{55}N_{17}O_5 + 2H_2SO_4$ für das Salmin und $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 + 2H_2SO_4$ für das Clupein entsprachen. Diese Formeln unterschieden sich von einander nur durch Mehr- oder Mindergehalt von H_2O . Die für Clupein gefundene Formel stimmte zugleich mit den Zahlen Piccard's und z. Th. auch Miescher-Cloetta's für das Salmin. Ausserdem ergaben sich auch bei der Untersuchung einiger physikalischer Eigenschaften keine Unterschiede zwischen Salmin und Clupein. Somit gelangte A. Kossel zu der Annahme der Identität beider Stoffe. Diese Annahme bedarf nach den oben mitgetheilten Analysen einer Einschränkung. Meine Analysen zeigen nämlich, dass in den Testikeln des Herings ein stickstoffärmerer Stoff vorkommt, welcher eine andere Zusammensetzung hat, wie das aus dem Lachssperma gewonnene Salmin. Man wird diesen stickstoffärmeren Stoff als das Clupein bezeichnen müssen. Ausserdem erhielt ich aber in einigen Fällen

aus Heringstestikeln Präparate, welche mit den von A. Kossel analysirten nahe übereinstimmen, und zwar geschah dies bei der Darstellung von Clupeinkupflerverbindungen. Diese wichen in ihrer Zusammensetzung von dem oben beschriebenen Clupeinplatinchlorid ab und erwiesen sich als reicher an Stickstoff.

Als Beispiel erwähne ich ein Präparat von Clupeinkupfersulfat, welches nur wenig Kupfer enthielt. Seine Darstellung war folgende:

Clupeinsulfat wurde in wenig Wasser gelöst, mit frisch bereitetem Kupferoxydhydrat zwei Stunden am Rückflusskühler gekocht und nach dem Abkühlen filtrirt. Es entsteht ein violett gefärbtes Filtrat, welches im Vacuum verdunstet und mit Alkohol gefällt wurde. Der mit Alkohol und Aether sorgfältig gewaschene Niederschlag wurde zunächst bei gewöhnlicher Temperatur, später bei 110° im Vacuum getrocknet.

Die Analysen ergaben folgendes Resultat:

	Gefunden		Mittel
	%	%	%
C	38.34	38.20	38.27
H	6.57	6.59	6.58
N	24.62	24.72	24.67
S	5.82	—	5.82
Cu	1.73	—	1.73

Dass die Zusammensetzung dieser Substanz sich den von A. Kossel gefundenen Werthen nähert, ersieht man am besten aus dem Verhältniss zwischen dem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt derselben, welches aus der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen ist.

	Gewichtstheile Kohlenstoff auf ein Gewichtstheil Stickstoff
Im Protaminsulfat aus Heringssperma (Kossel)	1.51
Im Protaminkupfersulfat aus Heringssperma (Goto)	1.55
Im Salminplatinchlorid (Goto)	1.55
Im Clupeinplatinchlorid (Goto)	1.81

Diese Zahlen zeigen also, dass aus den Heringstestikeln unter Umständen auch Protaminpräparate dargestellt werden können, welche reicher an Stickstoff oder ärmer an Kohlenstoff sind und sich in der Zusammensetzung dem Salmin nähern.

Man wird durch diese Thatsachen auf die Möglichkeit hingewiesen, dass die bisher analysirten Präparate aus dem Heringssperma trotz aller der oben angeführten Prüfungen doch noch ein Gemisch mehrerer einander sehr ähnlicher Körper darstellen. Hierbei ist zu bemerken, dass ich Platindoppelsalze ohne Schwierigkeit von constanter Zusammensetzung erhielt, die Kupfersalze, deren ich eine grössere Zahl analysirte, hingegen nicht. Es ist hiernach zu erwägen, ob nicht in dem Platinsalz eine lockere Verbindung zweier Protamine nach constantem Verhältniss vorliegt, die bei Darstellung der Sulfate und Kupfersalze gelöst wird ähnlich wie das Nucleohiston, ein Körper von unzweifelhafter chemischer Individualität, schon durch Kochsalz in seine Bestandtheile zerlegt wird. Hier müssen weitere Untersuchungen Aufklärung verschaffen.

III. Scombrin.

Die Darstellung der beiden Präparate des Scombrinplatinchlorids war dieselbe wie die des Clupein- und Salminsalses. Der im Vacuum bei 110° getrocknete Niederschlag ergab folgende Zahlen:

Präparat I.

0,1230 g gaben 0,0998 g $\text{CO}_2 = 23,51\%$ C und 0,0524 g $\text{H}_2\text{O} = 4,73\%$ H.

0,1158 „ „ 0,0995 „ $\text{CO}_2 = 23,43\%$ C „ 0,0486 „ $\text{H}_2\text{O} = 4,66\%$ H.

0,1918 g gaben 22,4 ccm N bei 15° C. und 753 mm B. = $13,55\%$ N.

0,1570 „ „ 18,4 „ N „ 16° C. „ 756 „ B. = $13,59\%$ N.

0,1513 g gaben 0,0365 g Pt = $24,12\%$ Pt.

0,1420 „ „ 0,1493 „ AgCl = $26,00\%$ Cl.

Präparat II.

0,1818 g gaben 0,1568 g $\text{CO}_2 = 23,52\%$ C und 0,0788 g $\text{H}_2\text{O} = 4,82\%$ H.

0,1640 „ „ 0,1413 „ $\text{CO}_2 = 23,49\%$ C „ 0,0708 „ $\text{H}_2\text{O} = 4,80\%$ H.

0,1620 g gaben 18,8 ccm N bei 14° C. und 756 mm B. = $13,58\%$ N.

0,1834 g gaben 0,0441 g Pt = $24,05\%$ Pt.

0,2514 „ „ 0,2642 „ AgCl = $25,98\%$ Cl.

Die Resultate sind in folgender Tabelle vereinigt:

	Präparat I		Präparat II		Mittel
	„	%	„	%	
C	23,51	23,43	23,52	23,49	23,49
H	4,73	4,66	4,82	4,80	4,75
N	13,55	13,59	13,58	—	13,57
Pt	24,12	—	24,05	—	24,09
Cl	26,00	—	25,98	—	25,99
O	—	—	—	—	8,11

Das Ergebniss lässt sich durch die Formel $C_{32}H_{72}N_{16}O_8$, $4 HCl + 2 PtCl_4$ ausdrücken, wie folgende Zusammenstellung ergibt.

	Berechnet für	Gefunden
	$C_{32}H_{72}N_{16}O_8, 4 HCl + 2 PtCl_4$	(Mittel)
C	23,58 %	23,49 %
H	4,71 %	4,75 %
N	13,79 %	13,57 %
Pt	23,92 %	24,09 %
Cl	26,12 %	25,99 %
O	7,86 %	8,11 %

Das von mir dargestellte Scombrinpräparat war somit ärmer an Stickstoff resp. reicher an Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff wie die Präparate Kurajeffs,¹⁾ deren Analyse zu der Formel $C_{30}H_{60}N_{16}O_6$ für das Scombrin führte.

IV. Sturin.

Die nach obigem Verfahren dargestellten zwei Präparate von Sturinplatinchlorid gaben folgende Analysenwerthe:

Präparat I.

- 0,2547 g gaben 0,2260 g CO_2 = 24,19% C und 0,1026 g H_2O = 4,48% H.
 0,1960 „ „ 0,1765 „ CO_2 = 24,55% C „ 0,0790 „ H_2O = 4,47% H.
 0,1420 g gaben 17,45 cm N bei 15° C. und 749 mm B. = 14,19% N.
 0,2865 „ „ 35,4 „ N „ 18° C. „ 751 „ B. = 14,10% N.
 0,1856 g gaben 0,0426 g Pt = 22,95% Pt.
 0,2638 „ „ 0,2716 „ AgCl = 25,45% Cl.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 524.

Präparat II.

0,1630 g gaben 0,1447 g CO₂ = 24,21% C und 0,0664 g H₂O = 4,52% H.
 0,1548 g gaben 19,0 ccm N bei 15° C. und 756 mm B. = 14,30% N.

0,1325 g gaben 0,0308 g Pt = 23,25% Pt.

0,3236 0,3322 AgCl = 25,38% Cl.

Zusammenstellung der Analysenresultate.

	Präparat I		Präparat II	Mittel
	%	%	%	%
C	24,19	24,55	24,21	24,32
H	4,48	4,47	4,52	4,49
N	14,19	14,10	14,30	14,20
Pt	22,95	—	23,25	23,10
Cl	25,45	—	25,38	25,42
O	—	—	—	8,47

	Berechnet für	Gefunden
	C ₃₄ H ₇₁ N ₁₇ O ₉ · 4 HCl + 2 PtCl ₄ :	(Mittel):
C	24,26 %	24,32 %
H	4,50 %	4,49 %
N	14,19 %	14,20 %
Pt	23,17 %	23,10 %
Cl	25,30 %	25,42 %
O	8,56 %	8,47 %

Das Gewichtsverhältniss von Stickstoff zu Kohlenstoff betrug in diesen Präparaten 1,71, während A. Kossel bei der Analyse des Sturinsulfats dasselbe zu 1,65 fand.¹⁾ Ueberhaupt nähern sich diese Ergebnisse denjenigen, welche Kossel gefunden hat, die Uebereinstimmung ist aber noch keine scharfe.

Die schwierige und wichtige Frage nach der procentischen Zusammensetzung der Protamine kann noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden, man wird vielmehr weiterer Untersuchungen bedürfen, die auf der bisher entwickelten Methodik fussen.

1) Diese Zeitschrift. Bd. XXV, S. 165.

B. Untersuchung der Protone.

A. Kossel benutzte zur Darstellung der Protone ein- stündiges Kochen des Protamins mit einer Mischung von 10 cem concentrirter Schwefelsäure und 90 cem Wasser. Es entstehen hierbei mehrere Producte, deren Zusammensetzung von Kossel nicht endgültig festgestellt wurde, vielmehr blieben die Angaben A. Kossel's darauf beschränkt, dass einer dieser Körper etwa der Formel $C_{30}H_{61}N_{17}O_8$ entsprach.

Ich habe mich bei der Darstellung der Protone darauf beschränkt, die Schwefelsäure in der Siedehitze nur so lange wirken zu lassen, bis die charakteristischen Reactionen, welche den Protaminen im Gegensatz zu den Protonen angehören, verschwunden waren: die so erhaltenen Producte stehen, wie die folgenden Untersuchungen zeigen, den Protaminen noch sehr nahe.

Die Darstellung gestaltete sich folgendermaassen:

5 g Protaminsulfat wurden in 40 cem Wasser gelöst und diese Lösung mit verdünnter Schwefelsäure soweit aufgefüllt, dass in 100 cem etwa 10 cem concentrirte Schwefelsäure vorhanden waren. Nach halbstündigem Kochen am Rückflusskühler ist das Protamin zersetzt, die Flüssigkeit ist farblos oder hellgelb geblieben, sie wird jetzt durch Aethylalkohol¹⁾ gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst und nochmals mit dem 5—6fachen Volumen Alkohol gefällt und die Fällung dreimal wiederholt. Die Reactionen des Sulfats waren folgende:

Die Eiweissfällung bei ammoniakalischer Reaction der Lösung, welche beim Protamin so scharf eintritt, war nicht mehr vorhanden. Die Biuretreaction tritt sehr kräftig ein. Niederschläge werden in 2%iger Lösung des Clupeonsulfats erzeugt durch Natriumpikrat und Natriumwolframat und Ferrocyankalium, Jodjodkalium, Goldchlorid, Platinchlorid, Quecksilberchlorid. Auch Phosphorwolframsäure und Jodquecksilber-

1) Dies Protosulfat wird bei Gegenwart von viel überschüssiger Säure leichter durch Aethylalkohol gefällt, ist hingegen die saure Reaction der Flüssigkeit nur eine geringe, so bewirkt man die Fällung besser durch Methylalkohol.

jodkalium in salzsaurer Flüssigkeit geben Niederschläge. Gesättigte Kochsalzlösung gibt keine Fällung. Die Reactionen von Molisch und von Hopkins treten in Clupeonlösung ebenso wenig ein wie beim Clupein.

An dieser Stelle möge eine sehr interessante Verbindung der Protamine und der Protone mit Kupferoxyd Erwähnung finden. Bringt man in eine Lösung von freiem Protamin oder Proton Kupferoxydhydrat, so löst sich das Metalloxyd unter Bildung einer violett gefärbten Verbindung auf. Man kann diese Verbindung darstellen, indem man das frisch gefällte und sorgfältig ausgewaschene Kupferoxydhydrat am Rückflusskühler mit Clupein oder Clupeonlösung kocht, vom überschüssigen Metalloxyd abfiltrirt, die violette Lösung im Vacuum eindampft, den Niederschlag in Wasser löst, noch zweimal mit Alkohol fällt und nach dem Auswaschen trocknet. Man erhält dann ein violettes Pulver, welches beim Clupeon 40,41% C, 6,35% H, 23,90% N, 11,62% Cu enthielt, während die analoge Verbindung des Clupeins 40,66% C, 6,05% H, 25,13% N und 9,23% Cu ergab. (Uebrigens erhielt ich auch Clupeonkupferpräparate mit geringerem Kupfergehalt.) Diese Verbindung ist es offenbar, welche bei der Biuretreaction des Protamins und Protons entsteht, und ihre Bildung ist deswegen interessant, weil sie zeigt, dass zum Zustandekommen der «Biuretreaction» die Gegenwart von Alkali nicht immer erforderlich ist.

Behufs Bestimmung des Molekulargewichts wurde das Clupeonsulfat durch eine genaue äquivalente Menge Barytlösung unter sorgfältigem Fernhalten der Kohlensäure von Schwefelsäure befreit, das Filtrat unter Kohlensäureabschluss getrocknet. Die bei 110° getrocknete Substanz wurde zunächst nach der Methode der Siedepunktserhöhung und sodann nach derjenigen der Gefrierpunktserniedrigung untersucht und gab folgende Werthe:

I. Siedemethode:

- | | | |
|----|-------|--------------|
| a) | 443.2 | |
| b) | 430.2 | Mittel 449.2 |
| c) | 384.2 | |

II. Gefriermethode:

a)	438,3	
b)	414,8	Mittel 423,7
c)	415,0	

Sieht man von der Bestimmung I c) ab, welche einen zu niedrigen Werth gab, so ist die Uebereinstimmung eine befriedigende. Da bei früheren Versuchen von A. Kossel eine Erhöhung des Siedepunkts beim freien Clupein nicht bemerkbar war, so muss man annehmen, dass die Protonbildung mit einer Spaltung des Protaminmoleküls Hand in Hand geht. Das gefundene Molekulargewicht darf man freilich nicht ohne Weiteres als feststehend annehmen. Da es sich um eine freie Base in wässriger Lösung handelt, ist eine Dissociation nicht ausgeschlossen.

Die Protone drehen ebenso wie die Protamine die Ebene des polarisirten Lichts nach links. Einige Bestimmungen der specifischen Drehung ergaben folgende Werthe:

Clupeonsulfat. Procentgehalt der Lösung 2,036, Beobachtungsrohr 2 Decimeter:

$$(\alpha)_D = - 49,11.$$

Freies Clupeon. Procentgehalt der Lösung 2,271, l = 2 Dm:

$$(\alpha)_D = - 22,02.$$

Beim Clupeinsulfat ist von A. Kossel $(\alpha)_D = - 85,49$ bestimmt worden. Die Linksdrehung hat also bei der Protonbildung abgenommen.

Scobrinsulfat. Procentgehalt der Lösung 2,00, l = 4 Dm:

$$(\alpha)_D = - 41,25.$$

Scobrinsulfat ergab nach meiner Bestimmung in 4,21%iger Lösung (Rohrlänge 2 Decimeter) eine Drehung entsprechend:

$$(\alpha)_D = - 72,2.$$

Dies stimmt überein mit dem Befunde Kurajeff's, welcher $(\alpha)_D = - 71,8$ feststellte.

Somit war auch hier beim Uebergang des Protamins in das Proton eine Abnahme der specifischen Drehung eingetreten

und zwar genau in dem gleichen Verhältniss wie beim Clupein (1,75 : 1).

Sturonsulfat. Procentgehalt der Lösung 2,00:

$$(\alpha)_D = - 22,5.$$

Sturinsulfat. In zwei Versuchen fand ich

$$(\alpha)_D = - 60$$

$$= - 58,8.$$

Somit war hier ebenfalls eine Abnahme der Drehung bei der Protonbildung vorhanden.

Um ein Urtheil über die der Protonbildung zu Grunde liegenden chemischen Vorgänge zu gewinnen, führte ich die Protone in die Platindoppelsalze über und analysirte dieselben.

Die Darstellung der Platinsalze wurde im Wesentlichen ebenso wie oben ausgeführt, nur musste ich hier noch sorgfältiger für die Entfernung des Wassers sorgen, um in der alkoholischen Lösung einen pulverigen und nicht einen klebrigen Niederschlag mit Platinchlorid zu erzeugen.

Ich stellte aus dem Protonsulfat, dessen Darstellung oben beschrieben ist, zunächst das Proton dar, indem ich die Schwefelsäure mit der äquivalenten Menge Baryt genau entfernte, das Filtrat eindampfte und trocknete. Das getrocknete Proton, welches Kohlensäure aus der Luft angezogen hat, wird mit einigen Tropfen concentrirter Salzsäure und dann mit grossen Mengen wasserfreien Methylalkohols versetzt. Zu dieser Lösung fügt man die wasserfreie verdünnte methylalkoholische Lösung von Platinchloridlösung unter Umrühren hinzu, solange noch weitere Bildung des Niederschlags zu beobachten ist, ein grosser Ueberschuss der Platinchloridlösung kann nachtheilig werden. Man erneuert den Methylalkohol sobald als möglich und wäscht mit absolutem Methylalkohol, zuletzt mit Aether aus. Den gewaschenen Niederschlag bringt man sofort in den Exsiccator, den man evacuirt.

Das Clupeonplatinchlorid gab folgende Werthe:

Präparat I.

0,2838 g gaben 0,2270 g $\text{CO}_2 = 21,81\%$ C und 0,1015 g $\text{H}_2\text{O} = 3,97\%$ H.

0,1782 g gaben 19,3 ccm N bei $12,5^\circ$ C. und 748 mm B. = $12,62\%$ N.

0,2796 g gaben 0,0727 g Pt = $26,00\%$ Pt.

0,3714 „ „ 0,4042 „ AgCl = $26,91\%$ Cl.

Präparat H.

0.1128 g gaben 0,0914 g $\text{CO}_2 = 22,09\%$ C und 0,0450 g $\text{H}_2\text{O} = 4,43\%$ H.
 0.1245 g gaben 13,8 ccm bei $15,5^\circ$ C. und 749 mm B. = $12,76\%$ N.

0.1208 g gaben 0,0308 g Pt = $25,49\%$ Pt.

0,2076 g gaben 0,2320 g AgCl = $27,63\%$ Cl.

Zusammenstellung der Analysenergebnisse:

	Präparat I	Präparat II	Mittel
	"	"	"
C	21,81	22,09	21,95
H	3,97	4,43	4,20
N	12,62	12,76	12,69
Pt	26,00	25,49	25,75
Cl	(26,91)	27,63	27,63 (Präp. II)
O	—	—	(7,78)

Diese Resultate entsprechen der Formel $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{N}_{14}\text{O}_8 \cdot 4\text{HCl} \cdot 2\text{PtCl}_4$.

	Berechnet für	Gefunden
	$\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{N}_{14}\text{O}_8 \cdot 4\text{HCl} + 2\text{PtCl}_4$	(Mittel)
C	21,87 %	21,95 %
H	3,94 %	4,20 %
N	12,79 %	12,69 %
Pt	25,36 %	25,75 %
Cl	27,69 %	27,63 %

Vergleicht man diese Formel mit der des Clupeins $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{N}_{14}\text{O}_9$, so kommt man zu dem Schluss, dass bei der hydrolytischen Zersetzung des Clupeins ein Proton gebildet wird, welches ärmer an C, H und O ist als das Clupein. Diese Beobachtung verdient volle Beachtung, steht aber doch vorläufig noch zu vereinzelt da, um als Grundlage für weitergehende Schlussfolgerungen zu dienen, und bedarf der Bestätigung um so mehr, da ich bei den Versuchen, in welchen ich die Kupferverbindungen des Clupeons und Clupeins analysirte, nicht immer dasselbe Resultat zu verzeichnen hatte. Die naheliegende Vermuthung, dass in dem Clupeinplatinchlorid von der Darstellung her ein Molekül Aethylalkohol etwa durch Veresterung ge-

bunden sei, während das Clupeonchlorid Methylalkohol oder keinen Alkohol bindet, konnte ich nicht bestätigen. Es gelang mir nicht, in den nach obiger Methode dargestellten Präparaten von Clupeinplatinchlorid Alkohol nachzuweisen.

Aus der Erniedrigung des Molekulargewichts muss man schliessen, dass bei der Bildung der Protone ein Zerfall des Protaminmoleküls stattfindet. Für die Untersuchung der Constitution des Protaminmoleküls ist es nun sehr wichtig, zu wissen, ob diese nebeneinander entstehenden Protone unter sich gleichartig sind oder nicht.

Man könnte sich das Protaminmolekül aus lauter gleichartigen Protongruppen zusammengesetzt denken, deren jede die Spaltungsproducte des ganzen Moleküls liefert und zu $\frac{1}{5}$ aus Arginin, zu $\frac{1}{5}$ aus Amidovaleriansäure und anderen noch unbekanntem Gruppen besteht. Man kann sich aber auch vorstellen, dass die Arginingruppen zu einem grossen Complex zusammengefügt sind, welcher $\frac{4}{5}$ des Clupeinmoleküls ausmacht und an welchem kleinere Gruppen, z. B. die Amidovaleriansäure bildende Gruppe, wie ein Anhängsel anhaften.

Wäre die zweite Anschauung richtig, so müsste man aus dem Clupeinmolekül Protone erhalten, welche in sich ungleichartig sind. Das eine Proton müsste vorwiegend oder ganz die Arginingruppen enthalten, also mehr als $\frac{4}{5}$ seines Gewichts an Arginin liefern; das andere vorwiegend oder ausschliesslich aus den anhängenden Monoamidosäuregruppen bestehen, also weniger Arginin liefern, als das ursprüngliche Clupein. Das erstere müsste einen mehr basischen Charakter tragen als das zweite und es wäre vorauszusetzen, dass in den nach obigem Verfahren mit Hülfe von Platinchlorid, Fällung des Sulfats u. s. w. dargestellten Proton vorzugsweise das argininreichere, basischere Proton enthalten ist.

Solche Erwägungen liessen es sehr wichtig erscheinen, die Menge des Arginins im Clupeon zu bestimmen. Ich führte zwei derartige Bestimmungen aus und erhielt fast dieselben Argininzahlen wie ein ursprüngliches Clupein. Von 100 Theilen Gesamtstickstoff waren etwa 80 Theile im Arginin enthalten.

Von 100 Theilen Gesamtstickstoff sind als Arginin vorhanden:

Im Clupein (Kossel und Kutscher)	Im Clupeon (Goto)	
	Präparat I	Präparat II
83,5	80,1	80,3

Somit ist in dem untersuchten Clupeonpräparat annähernd dieselbe Menge Arginin enthalten wie im Clupein. Dieses Resultat ist der ersteren Anschauung günstiger als der zweiten.

C. Weitere Spaltung des Clupeins.

Die weitere Spaltung des Clupeins untersuchte ich auf alkalimetrischem Wege. Hierbei zeigte sich zunächst das auffallende Resultat, dass die Spaltung des Clupeins mit Salzsäure eine Vermehrung, die mit Schwefelsäure eine Verminderung der Alkaleszenz herbeiführt. Die Ursache dieser Erscheinung ist zum Theil darin zu suchen, dass die Salzsäurespaltung eine Bildung von Ammoniak bewirkt, die Schwefelsäurespaltung hingegen nicht. Hier zeigen sich also Unterschiede, welche den von Ritthausen und Kutscher bei der Spaltung der Eiweisskörper bezüglich der Glutaminsäure beobachteten Erscheinungen analog sind.

Die schon vor längerer Zeit von A. Kossel mitgetheilte Beobachtung, dass die Bildung der biureteten Gruppen, also des Arginins und der Monoamidosäuren, aus den biuretgebenden unter der Einwirkung der Schwefelsäure ohne Abgabe von Ammoniak erfolgt, muss bei der Beurtheilung des Wesens der biuretgebenden Gruppe in Betracht gezogen werden. Hiernach ist es ausgeschlossen, dass das Verschwinden der biuretgebenden Gruppe bei diesen Protaminen auf der Spaltung eines Säureamids im gewöhnlichen Sinne des Wortes beruht.

Für die Beurtheilung der quantitativen Ergebnisse ist zunächst zu berücksichtigen, dass ein Molekül Arginin bei der Titration einem Alkaliäquivalent entspricht: von den vier Atomen Stickstoff des Arginins kann also eines als alkalisch reagirend betrachtet werden. Ich habe dies durch besondere Versuche, bei denen ich Rosolsäure und Congoroth als Indicator benutzte, festgestellt.

Ungefähr 1 g getrocknetes und gepulvertes Argimincarbonat wurde in 100 cem n_{10} Schwefelsäure gelöst, erhitzt und wieder genau auf 100 cem aufgefüllt.

10 cem dieser Lösung erforderten 5 cem n_{10} Natronlauge zur Neutralisation.

10 cem derselben Lösung lieferten bei der Kjeldahl-Bestimmung so viel Ammoniak, wie 20 cem n_{10} Normallauge entspricht.

Die Spaltungsversuche wurden folgendermaassen ausgeführt:

Versuch I.

3 g lufttrockenes Clupeinsulfat wurden in Wasser gelöst, unter Vermeidung eines Ueberschusses mit Barythydrat von der Schwefelsäure befreit und mit Wasser auf 50 cem aufgefüllt. Eine directe Titration in kleinen Proben ergab, dass zur Neutralisation der Gesamtmenge 80 cem n_{10} Natronlauge nöthig waren.

Von der 50 cem betragenden Gesamtmenge wurden 40 cem abgemessen, mit so viel einer Mischung von Schwefelsäure und Wasser versetzt, dass die ganze Mischung 33 Gewichtsprocente Schwefelsäure enthielt, 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht, durch überschüssiges reines Barythydrat von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom Baryt befreit, nach völliger Entfernung des kohlen-sauren Baryts und sorgfältigem Auswaschen auf ein Volumen von 100 cem gebracht.

Kjeldahl-Bestimmungen ergaben, dass 10 cem dieser Lösung 30.7 cem n_{10} Lösung entsprachen, demnach betrug der in 3 g des angewandten Clupeinsulfats vorhandene Stickstoff 383.75 cem n_{10} Lösung.

Von derselben Lösung wurden 20 cem abgemessen, mit 45 cem n_{10} Schwefelsäure angesäuert, erwärmt, auf 100 cem aufgefüllt und mit Natronlauge zurücktitirt. 20 cem der Lösung erforderten 6.9 cem n_{10} Natronlauge. Dasselbe Resultat erhielt ich bei einigen weiteren Titrirversuchen. Hiernach ist die Alkaleszenz der Flüssigkeit so gross, dass sie, auf die ganze Reactionsflüssigkeit aus 3 g Clupeinsulfat berechnet, 65.5 cem n_{10} Lösung entspricht.

Somit ist die Alkaleszenz der Flüssigkeit im ersten Versuch von 80 cem n_{10} Lösung auf 65 cem oder um 18.1% gesunken. Dieses Sinken kann nicht etwa auf ein unvollkommenes Auswaschen des Barytniederschlags zurückgeführt werden. A. Kossel und F. Kutscher bestimmten die Menge des bei der Spaltung des Clupeins im Barytniederschlage zurückbleibenden Stickstoffs zu 2—4% des Gesamtstickstoffs.

Versuch II.

3 g lufttrockenes Clupeinsulfat wurde in gleicher Weise untersucht.

Die Alkaleszenz des darin enthaltenen Clupeins entsprach 91.0 cem n:5 Natronlauge.

Der in der Gesamtflüssigkeit enthaltene Stickstoff entsprach 108.7 cem n:10 Lösung.

Die Alkaleszenz des Reactionsproducts entsprach 82.0 cem n:10 Lösung.

In diesem Versuch ist die Herabminderung der Alkaleszenz etwas geringer, sie beträgt 9,9% der Gesamtmenge, sie ist, wie im ersten Versuch, nicht durch die Versuchsfehler zu erklären.

Die Alkaleszenz des unzersetzten Protamins ist nach diesen Versuchen ungefähr so gross wie die des Arginins, welches daraus hervorgeht.

Nach Versuch I würden von 100 Theilen Stickstoff des Protamins 20,9 Theile die einem Aequivalent entsprechende alkalische Reaction besitzen. Dies entspricht der Alkaleszenz von $20,9 \times 4 = 83,6$ Theilen Argininstickstoff. Nach Kossel und Kutscher sind von 100 Theilen Stickstoff des Clupeins 83,5 Theile im Arginin abspaltbar. Bei dem zweiten Versuch besitzen von je 100 Theilen Stickstoff 22,2 Theile von vornherein die einem Molekül NH_3 entsprechende alkalische Reaction. Diese Alkaleszenz würde den gefundenen Arginingehalt nur um 5,3% des Gesamtstickstoffs überschreiten, eine Abweichung, die bei solchen Versuchen wohl noch als Analysenfehler gerechnet werden kann.

Wenn nun auch die Ergebnisse des zweiten Versuchs in quantitativer Hinsicht eine gewisse Abweichung von denen des ersten zeigen, so ist doch mit Sicherheit festgestellt worden, dass zugleich mit der Spaltung des Protamins eine Herabsetzung der Alkaleszenz eintritt. Die nächstliegende Erklärung hierfür ist Freiwerden einer Carboxylgruppe, die im ursprünglichen Protamin gebunden ist.

Es ist mir eine willkommene Gelegenheit, meinem hochgeehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. Kossel, für das bei meiner Arbeit mir bewiesene Wohlwollen und Interesse, sowie auch für die Freundlichkeit, mit der er mir die nöthigen Materialien zur Verfügung stellte, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.