

# Über Salmin und Clupein.

Von

A. Kossel und H. D. Dakin.

---

## I. Über die Monoamidosäuren des Salmins.

Unsere letzte Mitteilung<sup>1)</sup> über die chemische Zusammensetzung des Salmins enthielt die Angabe, daß dieses Protamin aus folgenden fünf Gruppen zusammengesetzt ist:

1. Harnstoffbildende Gruppe,
2. Diamidovaleriansäure, mit ersterer zu Arginin vereinigt,
3. Serin,
4. Monoamidovaleriansäure,
5.  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure.

Bald darauf erschien eine Arbeit von Abderhalden,<sup>2)</sup> welche sich ebenfalls mit den Monoamidosäuren des Salmins beschäftigte. Abderhalden fand außer den schon früher von A. Kossel als Spaltungsprodukte erkannten Gruppen des Arginins und der Pyrrolidinkarbonsäure noch das Alanin und das Leucin und bezeichnete das Vorhandensein des Phenylalanins und der Asparaginsäure als wahrscheinlich, machte indeß keine Angabe bezüglich des von uns gefundenen Serins und der Amidovaleriansäure.

Wären nun alle die bisher angegebenen Gruppen im Salmin vereinigt, so würde das Molekül dieses Körpers zwar reichhaltiger erscheinen, als unsern früheren Befunden entspricht, aber immerhin würde die von A. Kossel geäußerte Auffassung der Protamine als der einfachsten Eiweißkörper auch dann noch bestehen bleiben — gegenüber den Eiweißkörpern im älteren Sinne des Wortes würden sie noch immer einen einfacheren Typus darstellen. Aber wir können diese Erweiterung des Salminmoleküls nicht als richtig anerkennen, denn unsere er-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 565.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 55.

neuten Untersuchungen haben uns keine Bestätigung der Befunde Abderhaldens ergeben, wir erhielten vielmehr dasselbe Resultat wie früher.

Wir haben uns bei den früheren Versuchen der Spaltung mit siedender verdünnter Schwefelsäure bedient, sodann das Arginin in bekannter Weise mit Silbersulfat und Baryt entfernt und die  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure mit absolutem Alkohol extrahiert. Die Trennung von Serin und Amidovaleriansäure haben wir mit siedendem Methylalkohol und durch Umkristallisieren aus Wasser oder wässrigem Äthylalkohol bewirkt.

Abderhalden hat hingegen zur Spaltung des Salminsulfats konzentrierte Salzsäure benutzt, dies ganze Reaktionsprodukt mit Alkohol und Salzsäure verestert und dies Estergemisch nach dem Verfahren von E. Fischer durch fraktionierte Destillation zerlegt. Diese Estermethode ist besonders für die niederen Glieder der Amidosäurereihe ein sehr scharfes Mittel des Nachweises und wir mußten mit der Möglichkeit rechnen, daß uns geringe nur mit dieser Methode nachweisbare Mengen des Alanins früher entgangen seien. Wir stellten daher folgende Versuche an.

30 g Salminsulfat wurden in früher beschriebener Weise der Spaltung mit Schwefelsäure unterworfen und die Lösung nach Entfernung des Hauptteils der Schwefelsäure und nach passender Verdünnung durch Phosphorwolframsäure vom Arginin befreit. Aus der vom Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrierten Flüssigkeit entfernten wir die Phosphorwolframsäure durch Baryt und den Baryt durch eine genau entsprechende Menge Schwefelsäure, dampften die Flüssigkeit zur Trockne ein und extrahierten zur Entfernung der Pyrrolidinkarbonsäure mit absolutem Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur. Der in Alkohol unlösliche Teil, welcher das Alanin und das Leucin neben anderen Amidosäuren enthalten sollte, wurde nach der Vorschrift von E. Fischer verestert und diese Operation nach dem Eindampfen mehrfach wiederholt. Das mit Äther extrahierte Estergemenge fing unter 10 mm Druck erst bei 65° an zu destillieren und die Hauptmenge ging bei 67—75° über. Die bei 65—75° destillierende Fraktion wurde mit Wasser

verseift und die weiße Kristallmasse einmal aus Alkohol umkristallisiert. Die Analyse führte zu folgenden Zahlen:

Gefunden	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$
C 51,19	51,28
H 9,22	9,40

Die Kristalle bestanden demnach aus reiner Amidovaleriansäure ohne Beimischung von Alanin oder Leucin. Wir haben also mit der Estermethode nur denselben Körper wiedergefunden, den wir bereits auf andere Weise unter den Spaltungsprodukten des Salmis nachgewiesen hatten und der, wie es scheint, bei den Versuchen Abderhaldens nicht aufgetreten war. Zum Überfluß unterwarfen wir auch die alkohollösliche Fraktion demselben Veresterungsverfahren, ohne daß es gelang, Alanin nachzuweisen.

Die Abwesenheit des Leucins hatten wir schon aus unseren früheren Versuchen gefolgert. Wäre diese Amidosäure zugegen gewesen, so wäre es uns bei den Bd. 40 Seite 566 dieser Zeitschrift mitgeteilten Versuchen nicht gelungen, durch bloßes Umkristallisieren geringer Mengen der Spaltungsprodukte ein Präparat der Amidovaleriansäure mit gut stimmenden Analysenzahlen zu erhalten. Auch haben wir bei keinem unserer Versuche Beobachtungen gemacht, welche auf die Anwesenheit von kohlenstoffreicheren Amidosäuren oder von Asparaginsäure hindeuteten.

Die abweichenden Ergebnisse Abderhaldens sind wahrscheinlich auf die Beschaffenheit des untersuchten Salminpräparats zu beziehen. Das Salmin entsteht bei der Reifung der Samen an Stelle anderer Gewebsbestandteile, welche die Zusammensetzung der komplizierteren Eiweißkörper besitzen. Bei der Verarbeitung unreifer Testikel wird man daher Produkte erhalten, in denen die ihrer Zusammensetzung nach unbekanntesten Vorstufen des Salmis enthalten sind, und wir halten es für wahrscheinlich, daß dies bei dem Präparat Abderhaldens der Fall gewesen ist.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Abderhalden führt die bei der Darstellung und Reinigung des Salmis benutzten Fällungen mit Alkohol und Pikrinsäure an, erwähnt jedoch nicht, ob die fraktionierte Abscheidung des Salmisulfats als Öl aus wässriger Lösung ebenfalls ausgeführt worden ist. Wir halten letzteres Reinigungsverfahren für durchaus erforderlich.

Keinenfalls darf man aus der Verschiedenartigkeit unserer Versuchsergebnisse schließen, daß das Salmin überhaupt ein ungenügend definierter Eiweißkörper sei. Die im Jahre 1874 von Piccard<sup>1)</sup> publizierten Analysen ergeben dieselbe Zusammensetzung wie die späteren Untersuchungen und stimmen besonders mit den 1902 ausgeführten Bestimmungen Gotos<sup>2)</sup> genau überein. Auch haben wir bei der quantitativen Bestimmung des aus Salmin hervorgehenden Arginins gut übereinstimmende Werte aus verschiedenen Präparaten erhalten.

Unsere weiteren Versuche bestätigten das Vorkommen der von A. Kossel unter den Spaltungsprodukten dieses einfachsten Eiweißkörpers nachgewiesenen  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure.<sup>3)</sup> Zur Darstellung dieser Säure extrahierten wir das vom Arginin befreite Gemisch der Monoamidosäuren aus Salmin mit siedendem absoluten Alkohol, dunsteten das Alkoholextrakt ein und nahmen den Rückstand von neuem mit Alkohol auf, wobei eine geringe Menge Amidovaleriansäure ungelöst blieb. Wir versetzten nun die ziemlich konzentrierte alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid, wobei ein amorpher Niederschlag ausfiel. Gleichzeitig begann auch die langsame Abscheidung von Kristallen einer Quecksilber-Verbindung der Pyrrolidinkarbonsäure. Die Kristalle wurden nach 24 Stunden durch Schlämmen von dem klebrigen Niederschlag getrennt und in wässriger Lösung durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach dem Eindampfen der wässrigen Lösung hinterblieb ein teilweiser kristallisierter Rückstand, der das Chlorhydrat der Pyrrolidinkarbonsäure enthielt. Wir entfernten die Chlorwasserstoffsäure durch Silbersulfat und die Schwefelsäure durch die entsprechende Menge Baryt, dampften die Flüssigkeit ein und kristallisierten den Rückstand aus wenig Alkohol um. Die Kristalle ergaben die Zusammensetzung der Pyrrolidinkarbonsäure.

Gefunden	Berechnet für $C_5H_9NO_2$
C 52,03	52,17
H 7,60	7,83
N 12,12	12,17

<sup>1)</sup> Ber. d. deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 7, S. 17—18.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 94.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 311.

Die Substanz zeigte in wässriger Lösung eine Linksdrehung von  $[\alpha]_D = -77^\circ$ , ( $c = 1,739$ ); entsprechend der Angabe von E. Fischer, welcher  $[\alpha]_D = -77,4$  fand. Merkwürdigerweise lag aber der Schmelzpunkt unserer Substanz bei  $220\text{—}222^\circ$ , während E. Fischer für die l-Säure  $203\text{—}206^\circ$  angegeben hat.<sup>1)</sup>

## II. Quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte des Salmins.

Die von A. Kossel über die Stellung der Protamine zu den komplizierteren Eiweißstoffen geäußerten Ansichten sind zunächst auf Widerspruch gestoßen. Einige Forscher hielten die Ausdehnung des Begriffs «Eiweiß» über die althergebrachten Grenzen für unzulässig, glaubten vielmehr, in der Fähigkeit, Tiere zu ernähren, ein geeignetes Kriterium für die Präzisierung dieser chemischen Gruppe erblicken zu dürfen.<sup>2)</sup> Im Gegensatz dazu suchte A. Kossel durch eine möglichst weite Fassung dieses Begriffs zu einem Verständnis für das Wesen der Eiweißkörper zu gelangen. Er bemühte sich, eine chemische Reihe aufzufinden, an deren Ende die niedersten Homologen der Eiweißsubstanzen stehen.<sup>3)</sup>

Diese einfachsten oder niedersten Eiweißkörper sind die Protamine. Nach der Ansicht von A. Kossel gelangt man zu einer klaren und fruchtbaren Auffassung der ganzen Eiweißklasse, wenn man von den Protaminen ausgehend die Anlagerung von Monoamidosäuren und die Bildung einer kontinuierlichen Reihe von mehr und mehr komplizierten Substanzen bis zu den Histonen und dann zu den übrigen Eiweißkörpern verfolgt. An der Berechtigung dieser Anschauung ist heute kein Zweifel mehr möglich, besonders seit wir durch unsere letzten Mitteilungen erwiesen haben, daß nur solche Spaltungs-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 151—176.

<sup>2)</sup> cf. Hofmeister, Ergebnisse der Physiologie, Biochemie I, S. 797—798.

<sup>3)</sup> A. Kossel, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 34, S. 3232 u. f. Bulletin de la société chimique de Paris 1903. (Sitzung vom 30. Mai.)

produkte im Salmin zu finden sind, welche auch in den komplizierteren Eiweißkörpern vorkommen, seitdem sich ferner durch die Untersuchung des Cyklopterins, des Sturins und anderer Mittelglieder die Lücke zwischen den einfachsten Protaminen, z. B. dem Salmin und Clupein, und den basenreichen komplizierten Eiweißstoffen, z. B. den Histonen, mehr und mehr schließt. Wenn wir diese Körper als «einfache» oder «niedere» Eiweißkörper bezeichnen, so geschieht dies selbstverständlich nicht deshalb, weil wir voraussetzen, daß ihr Molekül kleiner sei, als das der komplizierteren Eiweißsubstanzen, sondern weil die Mannigfaltigkeit ihrer Zusammensetzung eine geringere ist.

Eine Einsicht in die Zusammensetzung des Moleküls versuchten wir durch quantitative Feststellung der einzelnen Gruppen in folgender Weise zu erhalten:

25 g Salmisulfat (lufttrocken) wurden mit einer Mischung von 75 g konzentrierter Schwefelsäure und 150 ccm Wasser 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und in der Reaktionsflüssigkeit die Menge des Stickstoffs nach Kjeldahl festgestellt. Wir fällten sodann das Arginin in bekannter Weise mit Silbersulfat und Baryt aus, dampften das Filtrat nach der Entfernung des Baryts mit Kohlensäure ein und kochten den Rückstand zweimal je eine halbe Stunde mit Alkohol aus. Der Alkohol wurde im Vacuum abdestilliert und der Rückstand von neuem mit absolutem Alkohol aufgenommen, hierbei verblieb ein in Alkohol unlöslicher Rückstand. Das Verdunsten des Alkohols und die Aufnahme des Rückstandes mit absolutem Alkohol wurde noch zweimal wiederholt, wobei zuletzt nur eine geringe Spur in Alkohol unlöslich zurückblieb. Diese in Alkohol unlöslich gewordenen Anteile vereinigten wir mit dem von vornherein in siedendem Alkohol unlöslichen Rest. Auf diese Weise waren die Spaltungsprodukte in drei Teile geteilt. Das Arginin konnte durch eine Stickstoffbestimmung im Silber-Niederschlag ermittelt werden, die Pyrrolidinkarbonsäure durch den Stickstoffgehalt des Alkoholextrakts, während der in Alkohol unlösliche Teil der Monoamidosäuren die Summe des im Serin und in der Amidovaleriansäure enthaltenen Stickstoffs

angab. Da das Verhältnis C:N in der Amidovaleriansäure ziemlich weit von dem im Serin gegebenen abweicht, so waren wir imstande, durch eine Elementaranalyse über die Mischungsverhältnisse dieser beiden Stoffe Aufschluß zu geben.

Der in Alkohol unlösliche Teil der Monoamidosäuren wurde daher durch Eindampfen im Vacuum vom Wasser befreit und der hellgelbe kristallische Rückstand nach dem Trocknen bei 60° in vacuo analysiert. Die Substanz enthielt — wie nach den vorhergehenden Operationen zu erwarten war — Asche und zwar 7,2%, im wesentlichen Kieselsäure. Nach Abzug der Asche wurden folgende Analysenzahlen erhalten:

Gefunden	Berechnet für $C_{11}H_{25}N_3O_8$
C 39,95	40,36
H 7,45	7,64
N 13,00	12,84

Hiernach ist eine Mischung von 2 Molekülen Serin und 1 Molekül Amidovaleriansäure anzunehmen.

Die bei der Analyse des Salmins erhaltenen Zahlen sind in folgenden Tabellen zusammengestellt.

	Gramm	Prozente
Gesamtstickstoff	5,369	100
Stickstoff d. Arginins	4,787	89,2
In Alkohol unlöslich	0,265	4,9
Davon Serin		3,25
» Amidovaleriansäure		1,65
In Alkohol löslich	0,230	4,3
Nachweisbarer Verlust	0,087	1,6

Für die Gewichtsverhältnisse der Spaltungsprodukte erhält man hiernach folgende Zahlen:

	Gramm	Prozente
Menge des zersetzten Salmins	17,03	100
Arginin	14,87	87,4
Serin	1,33	7,8
Amidovaleriansäure	0,74	4,3
Pyrrolidinkarbonsäure	1,88	11,0

Aus den mitgeteilten Analysenwerten lassen sich verschiedene Verhältnisse zwischen den Molekülen der Spaltungsprodukte berechnen, welche auch den von Piccard, Goto usw. ermittelten Analysenzahlen des Salminplatinchlorids genügen.

Ein solches ist zum Beispiel: 10 Mol. Arginin, 2 Mol. Serin, 1 Mol. Amidovaleriansäure, 2 Mol. Pyrrolidinsäure, welches zu der Formel  $C_{81}H_{155}N_{45}O_{18}$  führen würde, oder: 12 Mol. Arginin, 2 Mol. Serin, 1 Mol. Amidovaleriansäure und 3 Mol. Pyrrolidinkarbonsäure, welches die Formel  $C_{98}H_{186}N_{54}O_{21}$  verlangt. Im ersteren Falle ist dann ein Platinsalz von der Formel  $2(C_{81}H_{155}N_{45}O_{18}) + 22HCl + 11PtCl_4$ , im zweiten Falle  $2(C_{98}H_{186}N_{54}O_{21}) + 26HCl + 13PtCl_4 + 5H_2O$  anzunehmen, um den Analysen des Salminplatinchlorids zu entsprechen.

Das experimentelle Material ist aber noch nicht ausreichend, um einer der möglichen Formeln den Vorzug zu geben. Besonders kann die quantitative Bestimmung der Pyrrolidinkarbonsäure noch nicht als endgültig bezeichnet werden, und es ist trotz aller Vorsichtsmaßregeln nicht ausgeschlossen, daß ein gewisser Bruchteil der Amidovaleriansäure in das Alkoholextrakt hineingegangen ist. Wir beschränken uns daher vorläufig auf die Mitteilung des Tatsächlichen und behalten uns die eingehende Diskussion unserer Ergebnisse bis zur Beendigung unserer weiteren ergänzenden Untersuchungen vor. Immerhin glauben wir diesen Feststellungen, trotzdem sie nur vorläufige sind, ein besonderes Interesse zuerkennen zu müssen, denn wir haben hier den ersten Fall der vollständigen Aufteilung eines eiweißartigen Stoffs in seine Bestandteile.

### III. Über die Monoamidosäuren des Clupeins.

Im Clupein sind bisher folgende Atomgruppen aufgefunden worden: 1. Arginin,<sup>1)</sup> 2. Amidovaleriansäure,<sup>2)</sup> 3. Serin.<sup>3)</sup> Unsere in folgendem mitgeteilten Untersuchungen fügen zwei neue Gruppen hinzu: Alanin und Pyrrolidinkarbonsäure.

Die Analyse des Clupeins wurde in ähnlicher Weise quantitativ durchgeführt, wie die des Salmins und hierbei erhielten wir ungefähr die gleichen Verhältniszahlen für den Stickstoff des Arginins, der in Alkohol löslichen Substanz und des in Alkohol unlöslichen Amidosäuregemisches. Aber die Elementaranalyse der in Alkohol unlöslichen Substanz zeigte, daß hier nicht wohl eine Mischung von Serin und Amidovaleriansäure allein vor-

<sup>1)</sup> A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 165.

<sup>2)</sup> A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 590.

<sup>3)</sup> A. Kossel und H. D. Dakin, Diese Zeitschr., Bd. XL, S. 565.



liegen konnte. Wohl aber war ihr Ergebnis erklärlich, wenn man eine Mischung von 2 Molekülen Amidovaleriansäure, 1 Molekül Serin und 1 Molekül Alanin annahm.

Zum Nachweis des Alanins wurde die Hauptmenge des in Alkohol unlöslichen Teils der Amidosäuren nach dem Verfahren von E. Fischer verestert und der Destillation bei 10 mm Druck unterworfen. Die erste Fraktion ging bei 40 bis 45° über. Dieselbe wurde mit Wasser verseift, aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und analysiert.

Gefunden	Berechnet für $C_3H_7NO_2$
C 40,81	40,45
H 7,81	7,87

Diese Analyse beweist die Gegenwart des Alanins; die geringe Erhöhung des Kohlenstoffs ist wohl der Beimengung von etwas Amidovaleriansäure zuzuschreiben.

Die Pyrrolidinkarbonsäure wurde in ähnlicher Weise wie beim Salmin gewonnen, in die Phenylcyanatverbindung übergeführt und diese durch Salzsäure in das Hydantoin verwandelt. Letzteres gab bei der Analyse:

Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{12}N_2O_2$
C 66,5	66,67
H 5,6	5,56

Der Schmelzpunkt dieser Verbindung lag — in Übereinstimmung mit den Angaben von E. Fischer — bei 143°.

Das Clupein ist somit in seiner Zusammensetzung dem Salmin sehr ähnlich, es stellt aber bereits eine etwas reichhaltigere Kombination der Bruchteile des Eiweißmoleküls dar, da es an Stelle der fünf Gruppen des Salmis deren sechs enthält.