

Über die Einwirkung einiger Säurechloride auf Protamine.

Von
Dr. K. Hirayama.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Der Redaktion zugegangen am 23. März 1909.)

Die dem Salmintypus zugehörigen Protamine sind die einzigen natürlich vorkommenden Proteinstoffe, von deren Konstitution man ein ungefähres Bild zu entwerfen versucht hat. A. Kossel zieht aus seinen und H. Pringles Untersuchungen den Schluß, daß auf je 2 Argininmoleküle im Clupein 1 Molekül einer Monoamidosäure enthalten sei.¹⁾ Auf diese Weise werden Diarginylmonoamidosäuregruppen gebildet, welche in dem Molekül der einfachsten Proteinstoffe in größerer Anzahl miteinander verkettet sind.

Für den weiteren Ausbau dieser Vorstellungen schien es wünschenswert, über die Substituierbarkeit der am Stickstoff befindlichen Wasserstoffatome durch Säurereste einige Erfahrungen zu gewinnen, und ich habe, dem Vorschlage des Herrn Professor Dr. A. Kossel folgend, mich des Benzolsulfochlorids und des β -Naphthalinsulfochlorids bedient.

I. *β -Naphthalinsulfoclupein*. Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

1 g Clupeinsulfat wurde in 15 ccm Normalkalilauge gelöst und mit 1 g β -Naphthalinsulfochlorid in 20 ccm Äther gelöst, eine Stunde im Schüttelapparat geschüttelt, wobei die Reaktion stark alkalisch blieb. Nach kurzer Zeit begann die Ausscheidung einer teigigen Masse. Dieselbe ist in Wasser und Alkohol schwer löslich, in Äther unlöslich.

Zur weiteren Reinigung wurde diese Masse mit Wasser und Äther in wiederholt (etwa 20 mal) erneuerten Portionen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 301, 1906.

in der Reibschale durchgeknetet. Die Masse wurde sodann im Vakuumexsikkator getrocknet, wobei sie sich in ein weißes Pulver verwandelte. Der so gewonnene Körper diente zu Bestimmungen des Schwefels (nach der Asboth'schen Methode) und des Stickstoffs nach Kjeldahl. Es ergaben sich folgende Zahlen für drei Präparate verschiedener Darstellung:

	Präparat A			Präparat B	Präparat D	Mittel
	I.	II.	III.			
S	5,778	5,983	5,968	5,881	5,655	5,853%
N	18,07	18,08	18,10	17,74	17,90	17,98%

Das Molekularverhältnis S : N ist somit annähernd 2 : 14. Da nun nach den von M. Goto¹⁾ ausgeführten Analysen das Verhältnis der basischen Äquivalente des Clupeins ein solches ist, daß Chloroplatinat auf 14 N-Atome je 4 Valenzen der Platinchlorwasserstoffsäure entfallen, so ist in diesem Fall die Anzahl der substituierbaren Wasserstoffatome gerade halb so groß wie die der basischen Äquivalente des Clupeins.

Doch hat sich dies Verhältnis nicht als ein durchgehendes erwiesen. Die Schwankungen, welche sich bei den Analysen verschiedener Salze des Clupeins gezeigt haben, sind auch hier aufgetreten. Die Einwirkung des Naphthalinsulfochlorids führte nämlich bei einem anderen Präparat zu weitergehender Substitution, wie folgende Zahlen erweisen.

Präparat C	
S	6,478%
N	16,38%

Hier war das Atomverhältnis S : N = 17 : 100, während es bei den vorhergehenden Präparaten wie 14 : 100 gefunden war.

II. Benzolsulfoclupein. Noch größer war die Menge des eintretenden Säurerestes, als ich statt des Naphthalinsulfochlorids das Benzolsulfochlorid benutzte. Ich verfuhr bei der Darstellung dieser Präparate in ähnlicher Weise wie oben beschrieben, jedoch mit dem Unterschiede, daß ich das Benzolsulfochlorid nicht in ätherischer Lösung, sondern ungelöst direkt verwendete und daß ich auf 1 g Clupeinsulfat 2 g Benzolsulfochlorid benutzte, nachdem mir eine Reihe von vorläufigen Proben gezeigt

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 94, 1902.

hatten, daß bei diesem Mengenverhältnis die Ausbeute die größte war. Die Resultate ergeben sich aus folgender Zusammenstellung:

	Präparat A	Präparat B	Präparat C	Präparat D	
S	9.506	9.618	9.154	9.206	9.108 %
N	16.08	15.85	15.65	16.67	16.77 %

Trotz der Abweichung in der Zusammensetzung dieser Präparate läßt sich erkennen, daß die Substitution durch Säurereste fast doppelt so groß ist als im vorhergehenden Falle, daß die Menge der eingeführten Säurereste also der basischen Äquivalenz fast gleichkommen kann. Es würden nämlich nach Maßgabe der oben erwähnten am Chloroplatinat ausgeführten Analysen Gotos auf 100 Atome Stickstoff je 28,6 basische Äquivalente entfallen. Das Verhältnis der Stickstoffatome zu den durch die Benzolsulfogruppe substituierten Wasserstoffatomen ist aber von mir in Präparat B wie 100 : 26,5 gefunden worden. Selbstverständlich macht sich auch hier die Unsicherheit geltend, welche bezüglich der Formel des Clupeins immer noch herrscht.

III. *β-Naphthalinsulfoclupeon*. Zu weiteren Versuchen diente nun das Clupeon, welches aus krystallisiertem Clupeonpikrolonat¹⁾ dargestellt war. Dies Pikrolonat war dreimal aus heißem Wasser umkrystallisiert, es schmolz bei 186° (sinterte bei 180°) und enthielt 25,8% N.

Das Pikrolonat wurde durch Äther bei Gegenwart von überschüssiger Schwefelsäure von Pikrolonsäure befreit. Die Lösung des Clupeons drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach links, zeigte Biuretreaktion und fällte kein Eiweiß in schwach ammoniakalischer Lösung.

Die wässrige Lösung des Clupeons wurde mit einer ätherischen Lösung von Naphthalinsulfochlorid in alkalischer Flüssigkeit 5 Stunden geschüttelt. Nach dem Ansäuern fällt ein öliger, allmählich krystallinischer starrender Niederschlag, welcher in heißem Alkohol leicht, in Wasser wenig und in Äther nicht löslich ist. Derselbe wurde durch Umlösen aus heißem, wässrigem Alkohol gereinigt, doch gelang es nicht, die Masse wieder in völlig krystallisiertem Zustand zu erhalten. Ich erhielt fol-

¹⁾ Vgl. die vorhergehende Mitteilung von A. Kossel und F. Weiss. Diese Zeitschr., Bd. LIX, S. 281.

gende Analysenwerte für das im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Präparat.

	I.	II.	III.	IV.
S	9,384	9,399	9,404	9,328 %
N	9,458	9,488	9,483	9,469 %

Die Menge des eingetretenen Säurerestes war in diesen Präparaten eine weit größere wie beim Clupein. Das Atomeverhältnis des Stickstoffs zu den substituierbaren Wasserstoffatomen ist 9 : 3,9.

Wenn nun nach den oben erwähnten, durch die quantitative Spaltung begründeten Anschauungen von A. Kossel die Clupeone als Diarginylmonoamidosäuren aufzufassen sind, so würden diese Zahlen bedeuten, daß auf je ein Molekül des Clupeons vier durch Säurereste substituierbare Wasserstoffatome vorhanden sind.

Die von M. Goto ausgeführten Analysen der Kupferverbindung des Clupeons führen, wie früher von A. Kossel und H. Pringle hervorgehoben ist, zu der Formel eines Diarginylvalins $C_{17}H_{35}N_9O_{15}$.

Legt man diese Formel zugrunde, so erhält man für ein Tetra-naphthalinsulfo-Substitutionsprodukt die Formel $C_{57}H_{63}N_9O_{23}S_4$, mit welcher meine Analysen eine hinreichende Übereinstimmung geben.

Gefunden im Mittel:	Berechnet für $C_{57}H_{63}N_9O_{23}S_4$:
S 9,38 %	9,3 %
N 9,47 %	9,2 %

Selbstverständlich würde eine Mischung der dem Diarginylvalin homologen Protone ähnliche Analysenzahlen ergeben. Wenn sich nun auch über die Natur der mit dem Diarginylrest in Verbindung befindlichen Amidosäure hieraus noch kein Schluß ziehen läßt, so sind doch diese Resultate jedenfalls geeignet, eine weitere Stütze für die obigen Anschauungen zu gewähren.

Weitere im hiesigen Institut in Aussicht genommene Untersuchungen sollen nun entscheiden, ob die in das Protonmolekül eingetretenen Säurereste vollständig an den Stickstoff des Arginins gebunden sind und welcher Art diese Substitution ist.

IV. Einwirkung von β -Naphthalinsulfochlorid und Benzol-

sulfonchlorid auf Sturin. Bei dieser Reaktion erhielt ich Produkte, welche den oben beschriebenen Substitutionsprodukten des Clupeins sehr ähnlich sind und deren Analyse zu folgenden Zahlen führte.

Benzolsulfosturin		
	I.	II.
S	7.33	7.85 ^o
N	14.32	14.37 ^o

Diese Analysenzahlen können noch nicht zu weitergehenden Schlussfolgerungen benützt werden. Doch ist bemerkenswert, daß die Anzahl der eingetretenen Säurereste annähernd den basischen Äquivalenten des Sturins entsprechen, wie dies auch bei der Einwirkung des Benzolsulfochlorids auf Clupein der Fall ist (s. oben). Nach den von Goto ausgeführten Analysen des Chloroplatinats von Sturin entfallen auf 100 Mol. Stickstoff 23.5 Äquivalente der Platinchlorwasserstoffsäure. Bei meinen Bestimmungen ergibt sich das Atomverhältnis N : S für Präparat I wie 100 : 24.0, für Präparat II wie 100 : 22.4.

Bei der Untersuchung des β -Naphthalinsulfokörpers aus Sturin erhielt ich folgende Werte:

	I.	II.
S	7.46	7.42 ^o
N	12.96 : 12.73	12.3 ^o

Weder das Benzolsulfoprodukt noch der Naphthalinsulfokörper gab die dem Histidin zugehörige Reaktion mit Diazobenzosulfosäure, während dem Sturin, wie H. Pauly¹⁾ erwiesen hat, diese Reaktion eigen ist. Somit ergibt sich, daß die bei dieser Reaktion in Betracht kommenden Wasserstoffatome (oder das betreffende Atom) im Sturinmolekül frei, jedoch in Benzol- oder Naphthalinsulfosturin nicht mehr reaktionsfähig sind. Daraus ist zu folgern, daß einer der Säurereste in den Imidazolring des Histidins eingetreten ist, und wenn dies der Fall ist, wird man weiterhin schließen dürfen, daß der Imidazolring an der Peptidverkettung innerhalb des Moleküls dieser Proteinstoffe nicht beteiligt ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 508, 1904.