

## Zur Chemie der Protamine.

### I. Mitteilung.

#### Über das Protamin aus den Spermatozoen des kaspischen Störs, *Accipenser Guldenstädtii*.

Von

Dr. med. **W. D. Malenück.**

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. Juli 1908.)

---

Im Jahre 1906 wurde unter Leitung des Herrn Prof. Kurajeff im Universitätslaboratorium für medizinische Chemie zu Charkow eine Reihe von Arbeiten vorgenommen, welche sich auf das Studium der Protamine bei verschiedenen Fischarten bezogen. Zunächst wurde Milch einiger Repräsentanten aus der Klasse der *Accipenseridae* untersucht, die das Kaspische Meer bewohnen; nämlich: *Accipenser Stellatus*, *Accipenser Huso* und *Accipenser Guldenstädtii*. Wie bekannt, ist bis jetzt aus den Repräsentanten dieser Klasse auf Protamine hauptsächlich nur die Art des deutschen Störs, *Accipenser Sturio*, untersucht, welcher in der Nordsee vorkommt.

Was den *Accipenser Stellatus* anbetrifft, so kennen wir nach den Mitteilungen von Kurajeff, der die Untersuchungen über das in dessen Milch enthaltene Protamin angefangen hat, Tatsachen nur betreffs der elementaren Zusammensetzung des schwefelsauerer Protaminsalzes.

Das Sturin, welches A. Kossel<sup>1)</sup> aus den Milchen des deutschen Störs gewonnen hat, ist, dem Charakter der in ihm befindlichen basischen und monoamidosauren Komplexe nach, ein Protamin, welches sich scharf von den bekannten Protamin-

---

<sup>1)</sup> A. Kossel untersuchte nur ein Präparat, das schwefelsaure Sturin, während Goto das Chloroplatinat desselben analysierte. Anderweitige Analysen über dieses Protamin fehlen, soweit mir bekannt ist.

minen anderer Fische unterscheidet. Während das Salmin, Scombrin und Clupein, die am besten bekannten Protamine, nur eine Hexonbase — Arginin — enthalten, enthält das Sturin außer dem Arginin noch zwei andere Basen — Lysin und Histidin. Das Sturin enthält nach Kossel und Kutscher<sup>1)</sup> Stickstoff:

in Argininform	63,4%
in Lysinform	8,4%
in Histidinform	11,8%

Nicht weniger eigenartig hat sich dieses Protamin in bezug auf die in ihm vorgefundenen Monoamidosäuren herausgestellt; bis jetzt konnten darin nur das Alanin und eine dem Leucin sehr ähnliche Amidosäure entdeckt werden. Wie bekannt, ist das letzte noch in keinem Protamin vorgefunden worden. Leider sind die Ergebnisse über die genannten Amidosäuren noch nicht von allen Seiten festgestellt, ebenso wie die elementare Zusammensetzung dieses interessanten Protamins noch nicht für vollständig ergründet gehalten werden kann. Abgesehen davon, daß bis jetzt noch überhaupt sehr wenige Ergebnisse der Elementaranalyse vorliegen, sind dazu noch die Resultate derselben nicht übereinstimmend und führen zu ungleichen Molekularformeln. Infolge der so sehr interessanten chemischen Individualität dieses Protamins und des Vorhandenseins vielen Unaufgeklärten darüber in unserem Wissen, wie gezeigt wurde, habe ich auf Vorschlag von Herrn Prof. Kurajeff das Studium über das Protamin des Störs unternommen, welcher das Kaspische Meer bewohnt. Einige von den bei dieser Arbeit gewonnenen Tatsachen sind dabei mehr oder weniger präzise festgestellt worden und bilden den Stoff für diese Mitteilung.

Das Kaspische Meer bewohnen, wie bekannt, jetzt noch in ungeheurer Quantität 4 scharf verschiedene Arten der Ganoidfische aus der Familie der Accipenseridae: *Accipenser Stellatus*, *Accipenser Huso*, *Accipenser Rutenus* und *Accipenser Guldenstädtii*.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 185 (1900).



Die letzte Art hat die größte Ähnlichkeit mit dem deutschen Stör, obwohl sie sich in mancher Hinsicht auch von ihm unterscheidet<sup>1)</sup>).

Der russische Stör hat ein breites, abgerundetes Maul, die Oberlippe in der Mitte eingeschnitten, die Unterlippe rudimentär entwickelt; beim deutschen Stör finden wir dagegen das Maul bedeutend schmaler, dreieckig, die Oberlippe in der Mitte nur eingedrückt, die Unterlippe in zwei Hälften geteilt. Beim russischen Stör sind die Kopfdornen durch kleine Hautzwischenräume gesondert, beim deutschen kommen sie untereinander in Berührung. Die Rückenknorpel haben beim russischen Stör Dornfortsätze und berühren sich nicht, beim deutschen Stör sind sie ohne Dornfortsätze und haben keine Zwischenabstände. Der russische Stör hat 30—50 seitliche Knorpel, der deutsche — bedeutend weniger — 27—36.

Der russische Stör wiegt selten mehr als 100 kg, der deutsche häufig 240 kg.

### Darstellung der Protamine.

Die Gewinnung der Spermatozoenköpfe, in denen nach Miescher das Protamin in Form einer nucleinsauren Verbindung enthalten ist, wurde in gewöhnlicher Weise vollzogen: durch Ausziehen mit Wasser der zerkleinerten Milchen und Fällung des wässerigen Extraktes durch Ansäuerung mit Essigsäure. Die auf solche Art erhaltenen flockigen Niederschläge wurden abfiltriert, vom Filter in starken Spiritus übertragen und in solcher Form aus dem Fangorte der Fische transportiert. Zur Protamingewinnung wurden die im Spiritus aufbewahrten Niederschläge der Fischspermatozoenköpfe entfettet: zunächst durch Kochen mit starkem Spiritus (2—3 mal) und dann durch Ausziehen mit Äther im Soxhletapparat. Die auf diese Art entfetteten Spermatozoenköpfe wurden in feine Pulverform zerrieben. Das Protamin gewann ich mittels der Kosselschen Methode: aus einzelnen entfetteten Pulverportionen wurden durch 1—2% Schwefelsäure Extrakte hergestellt.

---

<sup>1)</sup> Brandt und Ratzeburg, Medizinische Zoologie, 1830.

Die Fällung des schwefelsauren Protaminsalzes wurde durch Zusatz von starkem Spiritus (96—98% in dreifachem Volumen) vorgenommen. Die ausgefällten weißen Niederschläge wurden nach 24 Stunden abgenutscht und mit Spiritus ausgewaschen. Die Hauptmasse des Protamins wurde schon aus den ersten drei schwefelsauren Extrakten gewonnen. Aus dem vierten Extrakt erhielt man durch Spirituszusatz entweder eine Trübung, oder aber einen kleinen Niederschlag; in allen folgenden Extrakten gab es bei Spirituszusatz keine Trübung mehr; dieselben Extrakte aber gaben bedeutende Niederschläge nach Zusatz von Natriumpikrat, oder freier Pikrinsäure. Weiterhin, wie bekannt, besteht die Darstellung und Reinigung der Protaminpräparate nach Kossel in folgendem:

1. Wiederholte Auflösung des Protaminsulfats in Wasser und Ausfällung durch Alkohol; 2. Überführung der Protaminsulfatlösung in öllartigen Zustand; 3. Überführung des Sulfats ins Pikrat und 4. Überführung dieser letzten Verbindung wieder in die Sulfatform. Alle diese Manipulationen sind nach Kossel bei Darstellung reiner Protaminpräparate unbedingt notwendig. In dieser Methodik ist die Bedeutung der wiederholten Auflösung des Protaminsulfats in Wasser und die Fällung desselben durch Spirituszusatz betont. Es ist aus den Arbeiten von A. Kossel und seinen Schülern ersichtlich, daß das Protaminsulfat beim wiederholten Auflösen und Ausfällen allmählich die Fähigkeit gewinnt, mit Spiritus flockige Niederschläge zu geben, die die Neigung zur Verklebung verlieren.

Was das Protaminsulfat von unserem kaspischen Stör ebenso wie desselben vom Accipenser Huso anbetrifft, so unterscheidet es sich in bezug auf die Niederschlagsbildung durch Spiritus vom Protaminsulfat des deutschen Störs, und zwar folgendermaßen: nachdem das Protaminsulfat von unserem Fisch einmal mit Spiritus ausgefällt und dann in Wasser aufgelöst ist, verliert es bei weiterem Spirituszusatz die Fähigkeit, flockige Niederschläge zu bilden; es gewinnt dabei ausgeprägte Verklebungseigenschaften und scheidet sich bei weiterem Spirituszusatz als homogene, fest an die Gefäßwand haftende halbdurchsichtige Masse. Auf Grund einer ganzen Reihe von



quantitativen Analysen ist es mir gelungen, das geschilderte Verhalten unseres Protamins zum Spiritus bis zu einem gewissen Grade aufzuklären. So hat es sich herausgestellt, daß bei wiederholter Fällung der Protaminsulfatlösung durch Spiritus der größte Teil der mineralischen Beimischungen entfernt wird, an denen die Sulfatpräparate der Protamine ziemlich reich sind. Weiterhin stellte es sich heraus, daß dabei hauptsächlich das schwefelsaure Calcium entfernt wird. Wie aus folgendem ersichtlich ist, vermindert sich bedeutend in einem und demselben Sulfatpräparat der Aschegehalt abhängig von der Anzahl der erwähnten Fällungen.

Nach der einmaligen Fällung durch Spiritus ist der Aschegehalt des Protaminsulfats 3,75 ‰

nach 3maliger 2,74 ‰

» 5maliger 2,06 ‰

» 7maliger 1,32 ‰

Ebenso demineralisierend wirkte, wenigstens was das schwefelsaure Calcium anbetrifft, die Verdampfung der wässerigen Protaminsulfatlösungen; bei ihrer Eindichtung fielen große Massen von Calciumsulfatkrystallen aus. Dieselbe Ausfällung von kristallinischem Calciumsulfat fand auch statt beim Stehen der Protaminsulfate in ölförmigem Zustand. Die Präparate des Protaminsulfats enthielten nach dreimaliger Fällung mit Spiritus, nach Eindichtung ihrer wässerigen Auflösungen und danach folgender Aufbewahrung in öliger Form sehr unbedeutende Aschequantitäten: 0,82 ‰, 0,52 ‰, 0,48 ‰, 0,39 ‰.

Nicht ohne Interesse ist die Tatsache, daß die Protaminsulfatpräparate aus den ersten Extrakten, unter übrigens gleichen Bedingungen ihrer Darstellung, bedeutend mehr Mineralsubstanzen enthalten, als die Präparate aus den folgenden Extrakten.

Der Aschegehalt der Protaminsulfatpräparate aus einer und derselben Spermatozoenportion ist

aus dem	I.	Extrakt	4,76 ‰
»	»	II.	» 2,90 ‰
»	»	III.	» 1,74 ‰
»	»	IV.	» 0,82 ‰

Also geht der Hauptteil der Mineralsubstanzen schon in die ersten schwefelsauren Extrakte über. Die mangelhafte Fällbarkeit durch Spiritus des vierten und der folgenden Extrakte, trotzdem dieselben zweifellos noch Protamin enthalten, ist höchstwahrscheinlich, wenigstens zum Teil, auch vom niedrigen Salzgehalt abhängig. Die Protaminsulfatlösungen, welche keine flockigen Niederschläge durch Spiritus mehr gaben, bildeten solche sofort bei Zusatz von  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaSO}_4$  und  $\text{ClNa}$ . Leider ist in den Mitteilungen von den Autoren, welche über die Protamine gearbeitet haben, fast nichts über Aschegehalt in den von ihnen untersuchten Präparaten erwähnt, weshalb es auch unmöglich ist, darüber zu urteilen, inwiefern die Fällbarkeit oder Unfällbarkeit des schwefelsauren Protamins durch Spiritus durch den Salzgehalt bedingt wird.

A. Kossel hält die Überführung des Protaminsulfats durch den ölartigen Zustand augenscheinlich für eine Hauptbedingung zur Erhaltung reiner Präparate; welche Bedeutung aber dieses methodologische Moment in der Tat hat — darüber ist nirgends etwas Bestimmtes erwähnt.

Wie aus dem vorhergesagten zu ersehen ist, wird durch die Überführung des Protaminsulfats durch den ölförmigen Zustand ein bedeutender Teil der Mineralsubstanzen entfernt. Inwiefern diese Manipulation zur Reinigung der Protaminpräparate von anderen Beimischungen beiträgt, und von welchen nämlich — können wir auf Grund persönlicher Beobachtungen nicht bestimmt sagen. Nach unserer Erfahrung können wir nur feststellen, daß das Entfernen der Adeninbeimischung (welche sich stets in unseren Präparaten vorfand) dadurch nicht garantiert wird; wir erhielten in Aceton unlösliche Pikratreste ebenso aus den Protaminsulfatpräparaten ohne wie mit vorläufiger Überführung durch den ölförmigen Zustand. Die im Aceton unlöslichen Pikratniederschläge bestanden hauptsächlich aus Adeninpikrat. Die Gewinnung des schwefelsauren Protamins aus den ölartigen Lösungen bot bei unserem Fische keine Schwierigkeiten. Die Protaminsulfatpräparate, welche aus dem Pikrat dargestellt und durch tierische Kohle entfärbt wurden, gaben gewöhnlich ganz farbloses Öl. Die Fähigkeit der Protamin-



minsulfatlösungen, bei bestimmter Konzentration in ölförmigen Zustand überzugehen, ist jedenfalls eine charakteristische Eigentümlichkeit der Protamine.

Die Überführung des Protamins durch das Pikrat wieder in die Sulfatform ist in der Kosselschen Methode eine der schwierigsten Manipulationen. Wie bekannt, spaltet sich hier die Pikrinsäure ab infolge der Ansäuerung mit Schwefelsäure. Das in Wasser unlösliche Protaminpikrat gibt jedoch, wie es sich in der Tat herausstellte, sehr schwierig die Pikrinsäure ab, weshalb man genötigt ist, große Quantität von Schwefelsäure zuzugeben und ziemlich lange mit Äther auszuschütteln. Das Protaminpikrat wird beim Ausschütteln mit Äther unter Säurezusatz sehr klebrig, setzt sich fest an die Wand des Scheidetrichters, wonach die einzelnen Protaminpartikelchen am Trichterboden unten zur Verklebung kommen, die Öffnung desselben schließen, was die ganze Manipulation an und für sich komplizierter macht und unvermeidlich zu bedeutenden Verlusten führt.

Nach einer ganzen Reihe von Vorversuchen ist es uns gelungen, die Pikrinsäure aus dem Protaminpikrat bedeutend einfacher abzuspalten und dasselbe nachher wieder in die Sulfatform überzuführen. Die Vereinfachung dieser Manipulation besteht in Anwendung eines Lösungsmittels, in welchem sich nicht nur die Pikrinsäure leicht löst, sondern auch selbst das pikrinsaure Protamin.

Um dies zu erreichen, wurde der Äther durch Aceton ersetzt. Der Hauptvorteil des letzteren besteht in der Schwerlöslichkeit des Protaminsulfats in diesem Lösungsmittel, weshalb das Protaminsulfat bei Schwefelsäurezusatz zur Acetonprotaminpikratlösung in Form eines flockigen Niederschlages ausfällt, wobei die Pikrinsäure im Aceton gelöst bleibt. Als wir die Protaminpikratniederschläge im Aceton auflösten, haben wir uns überzeugen können, daß diese Niederschläge nicht einheitlich sind: bei Auflösung der letzten erhielten wir Reste, manchmal bedeutende, die im Aceton unlöslich blieben; dabei wurden diese Reste beim Stehenbleiben in Aceton stets weicher und krystallisierten in Form von einer verfilzten, wolligen Masse, welche aus zarten haarförmigen Krystallen bestand. Diese Sub-

stanz hat sich bei weiterer Untersuchung als Adeninpikrat herausgestellt. Solche in Aceton unlösliche Pikratreste wurden nicht nur aus Protaminpikraten erhalten, die durch direkte Fällung der schwefelsauren Extrakte mit Natriumpikrat gewonnen wurden, sondern auch aus solchen Pikratpräparaten, deren Protamin vorher wiederholt mit Spiritus gefällt und in den ölartigen Zustand übergeführt worden war. Infolgedessen wäre es nicht grundlos, zu vermuten, daß die Protaminsulfatpräparate, welche nach der gewöhnlichen Kosselschen Methode erhalten wurden, kaum frei von Beimischung der genannten Base (Adenin) sein konnten. Die Konstatierung dieser verunreinigenden Substanz ist desto schwieriger, weil das Adenin einen Xanthinkörper darstellt, welcher die den meisten von diesen Körpern eigene Murexidprobe nicht gibt. Infolge des hohen Stickstoffgehaltes des Adenins (51,8 %) könnte es bei Anwesenheit in den Protaminpräparaten sogar in minimaler Quantität den N-Gehalt der letzteren bedeutend steigern. Bei dem gewöhnlichen Fällungsprozeß des Protamins erhält man von dem vierten Extrakte an schon keine Niederschläge mehr nach Zusatz des dreifachen Spiritusvolumens, während man bei Natriumpikratzusatz noch bedeutende Protaminquantitäten auch aus den folgenden Extrakten erhält. Auf Grund von vergleichenden Analysen ist die Protaminausbeute bei Fällung durch Natriumpikrat beinahe um 10 % größer im Vergleich mit der Quantität desselben bei der Spiritusmethode. So haben wir bei der Protamingewinnung den Spiritus als Fällungsmittel des Protamins aus den schwefelsauren Extrakten der Milchen ganz fallen lassen und bedienen uns heutzutage zur Gewinnung der Protamine ausschließlich der unten beschriebenen, von uns erfundenen, bequemen und billigen Pikrinacetonmethode.

Die Gewinnung der schwefelsauren Extrakte wurde in gewöhnlicher Weise durch Schütteln und Zerreiben des entfetteten Spermatozoenpulvers mit 2 % Schwefelsäure während einer halben Stunde für jeden einzelnen Extrakt erreicht. Die weiteren Manipulationen waren die folgenden:



### I. Darstellung der Pikratniederschläge aus den Extrakten.

Die schwefelsauren Extrakte werden bei ununterbrochenem Rühren mit wässriger Natriumpikratlösung zusammengebracht, bis sich exquisit flockige gut gefällte, orangegelbe Niederschläge bilden; dabei muß das Filtrat hell ohne Opalescenz und Trübung bleiben. Bei weiterem Natriumpikratzusatz erhält man aus dem Filtrat noch bedeutende Pikratniederschläge; vorteilhafter ist es aber, dieselben Niederschläge nach der Abnutschung der Hauptniederschlagsmasse zu gewinnen und danach weiterer Bearbeitung und Reinigung gesondert zu unterwerfen.

Die zuerst erhaltenen Niederschläge (bei noch hellem Filtrat) geben die besten, an Aschegehalt ärmsten, Präparate. Den Hauptbestandteil dieser Präparate bildet das Protamin (ungefähr  $\frac{3}{4}$  der Gesamtquantität). Die Niederschläge des Protaminpikrats werden fest, können aber leicht in sandige Pulverform zerrieben und ohne Schwierigkeit abgenutscht und ausgewaschen werden. Die abgenutschten und mit  $H_2O$  ausgewaschenen Pikratniederschläge müssen zunächst an der Luft getrocknet und nachher erst im Aceton aufgelöst werden.

### II. Die Auflösung in Aceton.

Zur Auflösung haben wir angewendet Aceton von Kahlbaum bei  $56-58^\circ C$ . Reines Protaminpikrat löst sich leicht in Aceton, indem es orangegelbe durchsichtige Lösungen bildet ohne Trübung und Opalescenz. Zur Erleichterung des Auflösungsprozesses ist es gut, die Pikratniederschläge zunächst in der Reibschale mit Aceton zu zerreiben, darauf werden die in Aceton unlöslichen Pikratreste einfach abfiltriert.

Zu der abfiltrierten Acetonlösung wird vorsichtig tropfenweise  $H_2SO_4$  zugesetzt, um dadurch das Protaminpikrat in die Sulfatform überzuführen. Schwefelsäure wird solange zugegeben, bis sich Sulfatniederschläge noch zu bilden vermögen. Die Säure muß in kleinen Portionen zugesetzt werden, weil das Protaminsulfat sich im Überschuß der Säure ziemlich leicht löst und aus der Acetonlösung nicht mehr ausfällt. Die bei  $H_2SO_4$ -Zusatz erhaltenen Sulfatniederschläge sind zunächst flockig, setzen

sich leicht zu Boden, werden danach fest und leicht zerrieben oder beim Schütteln in feines Pulver zerschlagen. Die abgesetzten Protaminsulfatniederschläge werden leicht abgetrennt, zunächst durch vorsichtiges Dekantieren und dann mit Aceton ausgewaschen. Die auf solche Weise erhaltenen Protaminsulfatniederschläge besitzen schwach gelbe Farbe wegen der anhaftenden Pikrinsäure, deren Entfernung durch Auswaschen der Niederschläge auf dem Filter oder der Nutsche nicht leicht zu erzielen ist. Dagegen wird die Pikrinsäure leicht und einfach entfernt durch wiederholte Auflösung des Niederschlags in  $H_2O$ , Fällung der eingedampften Lösungen und Zerreiben mit Aceton in dem Mörser. Dabei fällt das Protaminsulfat aus in Form von einer klebrigen Masse, welche, je nach dem Acetongehalt, beim Zerreibungsprozeß hart wird. Zur Vermeidung rascher Verhärtung muß das Aceton im Anfang in ziemlich kleinen Portionen zugesetzt werden, damit es möglich ist, die klebrige Sulfatmasse in Gegenwart von Aceton langsamer zu zerreiben. Nachher wird die Pikrinsäure enthaltende Acetonlösung durch Dekantieren entfernt. Die zurückbleibende Masse wird, falls sie noch sichtbare Pikrinsäurereste enthält, in heißem  $H_2O$  gelöst, die Auflösung eingedampft und von neuem mit Spiritus und Aceton zerrieben. Um langwierige Eindampfung zu vermeiden, ist es vorteilhaft, die klebrige Sulfatmasse in möglichst kleiner Quantität von heißem  $H_2O$  in der Reibschale aufzulösen, wieder zur Fällung zu bringen und mit Aceton zu zerreiben. Nach dreimaliger Auflösung und Fällung durch Aceton ist die Pikrinsäure vollkommen entfernt. Ist es wünschenswert, das Protaminsulfat in trockener pulverartiger Form zu erhalten, so wird die klebrige Sulfatmasse in  $H_2O$  aufgelöst, dann eingedichtet, filtriert und rasch in der Reibschale zerrieben, zunächst mit Aceton und dann, nach Entfernung des letzteren, durch Dekantieren mit wasserfreiem Alkohol und Äther. Beim Zugießen des letzteren wird die klebrige, zähe Sulfatmasse bald spröde und kann leicht zu Pulver zerrieben werden; das letztere wird auf dem Filter oder der Nutsche gesammelt, wo es vor dem Trocknen nochmals mit wasserfreiem Alkohol und Äther ausgewaschen wird. Das Protaminsulfat wird zu-



nächst im Vakuumapparat bei gewöhnlicher Temperatur über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und weiterhin im Thermostaten bei  $110^\circ\text{C}$ . getrocknet. Die nach dieser Methode erhaltenen Präparate von Protaminsulfat aus den ersten drei Extrakten enthielten Asche:  $0,34\%$ ;  $0,33\%$  und  $0,29\%$ ; die Sulfatpräparate aus den folgenden Auszügen enthielten noch weniger Asche:  $0,12$ — $0,1\%$ . Nach der beschriebenen Methode erhält man reinere Präparate des Protaminsulfats betreffs des Aschegehaltes, als durch die gewöhnliche Kosselsche Methode. Auf diese Weise gewonnene Protaminsulfatpräparate stellen das Grundmaterial dar zur Erhaltung aller anderen Protaminverbindungen. Zur weiteren Reinigung des auf diese Weise gewonnenen schwefelsauren Salzes des Protamins wurde es in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst; die Lösung wurde eingedampft und in Ölform übergeführt. Die erhaltene ölarartige Flüssigkeit wird filtriert, mit Wasser verdünnt, durch Natriumpikrat gefällt, wie es auch das erstemal geschah; der Pikratniederschlag wird abgesaugt, ausgewaschen, ausgetrocknet und in starkem Aceton aufgelöst. Dabei erhält man noch einen kleinen in Aceton unlöslichen Rest. Aus der abfiltrierten Auflösung des Protaminpikrats wird das Sulfat durch Schwefelsäurezusatz gefällt. Das von den Pikrinsäureresten befreite Protaminsulfat wird durch die obenbeschriebene Methode in Pulverform übergeführt und bis zum konstanten Gewicht bei  $108$ — $110^\circ\text{C}$ . ausgetrocknet. Bei der Analyse dieses Sulfats wurde erhalten:

I.  $0,3449\text{ g}$  Substanz gaben bei Verbrennung:  $0,4775\text{ g CO}_2$  und  $0,2034\text{ g H}_2\text{O}$ , was  $37,76\%$  C und  $6,55\%$  H entspricht.

II.  $0,3100\text{ g}$  Substanz gaben  $0,4265\text{ g CO}_2$  und  $0,1863\text{ g H}_2\text{O}$ , was  $37,52\%$  C und  $6,68\%$  H entspricht.

III.  $0,1890\text{ g}$  Substanz gaben  $34,7\text{ ccm N}$  bei  $750\text{ mm Hg}$  und  $18^\circ\text{C}$ ., was  $39,558\text{ mg N}$  und  $20,93\%$  entspricht.

IV.  $0,2562\text{ g}$ , nach Kjeldahl analysiert, gaben  $38,3\text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-norm.-NH}_3$ , was  $53,62\text{ mg N}$  ausmacht und  $20,92\%$  entspricht.

V.  $0,4152\text{ g}$  Substanz gaben  $0,2236\text{ g BaSO}_4$ , was  $0,0940\text{ g H}_2\text{SO}_4$  ausmacht und  $22,64\%$  entspricht.

VI.  $0,3746\text{ g}$  Substanz gaben  $0,2008\text{ g BaSO}_4$ , was  $0,08446\text{ g H}_2\text{SO}_4$  und  $22,54\%$  entspricht.

VII.  $0,4638\text{ g}$  des Präparats gaben  $0,0014\text{ g Asche}$ , was  $0,3\%$  entspricht.

Im Mittel enthält das schwefelsaure Protamin:

C	=	37,64%
H	=	6,61%
N	=	20,92%
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	=	22,59%

Ich habe noch ein Sulfatpräparat dargestellt durch Überführung des Sulfatprotamins (das eben geschildert wurde) durch das Chlorid nach der Methode von Goto: das Chlorid wurde in Pikrat und das letzte wieder in das Sulfat übergeführt. Das Pikrat löste sich in Aceton vollständig.

Bei der Analyse dieses bis zum konstanten Gewicht bei 100° C. ausgetrockneten Präparates wurden folgende Zahlen erhalten:

VIII. 0,2752 g Substanz gaben 0,3768 g CO<sub>2</sub> und 0,1706 g H<sub>2</sub>O, was 37,34% C und 6,88% H entspricht.

IX. 0,3387 g Substanz gaben 0,4642 g CO<sub>2</sub> und 0,2014 g H<sub>2</sub>O, was 37,38% C und 6,61% H entspricht.

X. 0,1585 g Sulfat gaben 30,2 ccm N bei 751,1 mm Hg und 24,7° C., was 33,2653 mg N = 20,98% entspricht.

XI. 0,1722 g Substanz gaben 32,2 ccm N bei 748 mm Hg und 21° C., was 36,064 mg N = 20,94% entspricht.

XII. 0,2912 g des Präparates gaben 0,1558 g BaSO<sub>4</sub>, was 0,06553 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 22,50% entspricht.

XIII. 0,3522 g Substanz gaben 0,1880 g BaSO<sub>4</sub>, was 0,07907 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 22,45% entspricht.

Kleine Spuren von Asche.

Im Mittel ist auf Grund des angeführten analytischen Materials die elementare Zusammensetzung des Präparates folgende:

C	=	37,36%
H	=	6,74%
N	=	20,96%
O	=	27,60%
S	=	7,34%

Die gefundenen Analysenzahlen für dieses Präparat stimmen am besten mit der Formel C<sub>27</sub>H<sub>55</sub>N<sub>13</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> überein.

Berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>55</sub>N<sub>13</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:      Gefunden im Mittel:

C = 37,28%	37,36%
H = 6,79%	6,74%
N = 20,94%	20,96%
O = 27,62%	27,60%
S = 7,36%	7,34%



Die von uns berechnete Formel des schwefelsauren Salzes unseres Protamins unterscheidet sich von der Formel, welche A. Kossel<sup>1)</sup> für das von ihm erhaltene schwefelsaure Sturinsalz angegeben hat:  $4 C_{36}H_{69}N_{19}O_7 + 11 H_2SO_4$ .

In dem von ihm erhaltenen und untersuchten Präparat wurde im Mittel gefunden:

C	H	N	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
37,42%	6,52%	22,64%	22,69%

Wie man sieht, unterscheidet sich das schwefelsaure Protamin aus den Spermatozoen unseres Störs von demjenigen des deutschen Störs nur durch etwas kleineren Stickstoffgehalt.

#### **Die Untersuchung des in Aceton unlöslichen Pikratniederschlags.**

Wie schon oben bewiesen wurde, fällt aus den schwefelsauren Spermatozoenextrakten bei Natriumpikratzusatz gleichzeitig mit dem Protaminpikrat auch noch eine Pikratverbindung einer anderen Substanz aus. Im Gegensatz zum Protaminpikrat ist das letztere Pikrat in Aceton schwer löslich, weshalb man es ziemlich leicht vom Protaminpikrat befreien und reinigen konnte. Um den chemischen Charakter dieser Substanz aufzuklären und die Protaminpikratreste zu entfernen, wurden die in Aceton unlöslichen Pikratverbindungen abgesaugt, mit Aceton ausgewaschen und dreimaliger Krystallisation aus H<sub>2</sub>O unterworfen. Die erhaltene krystallinische Pikratverbindung wurde dann mit Aceton ausgewaschen und in Gegenwart des letzteren durch vorsichtigen Zusatz von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> von der Pikrinsäure befreit und in das Sulfat übergeführt. Die Sulfatlösung, die noch immer die Biuretreaktion, wenn auch schwach, gab, wurde zur weiteren Reinigung von der Protaminbeimischung durch Natriumpikrat gefällt und die erhaltene Pikratverbindung wurde dann von neuem in das schwefelsaure Salz übergeführt. Die aus der wässrigen Lösung erhaltenen, fast farblosen Krystalle dieses Salzes wurden getrocknet, in Pulverform zerrieben und endlich bis zum konstanten Gewicht bei 110° C. ausgetrocknet. Bei der Analyse dieses Präparates ist gefunden worden:

<sup>1)</sup> A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 174.

1. 0,178 g Substanz gaben 0,0638 g H<sub>2</sub>O und 0,2176 g CO<sub>2</sub>, was 3,98% H und 33,34% C entspricht.

2. 0,1860 g Substanz gaben 63 ccm N bei 26° C. und 747,5 mm Hg, was 0,0687015 g N = 36,94% entspricht.

3. 0,2605 g des Präparates gaben 0,1578 g BaSO<sub>4</sub>, was 0,021672 g S = 8,32% entspricht.

Also haben wir für dieses Präparat erhalten:

$$C = 33,34\%$$

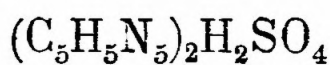
$$H = 3,98\%$$

$$N = 36,94\%$$

$$O = 17,42\%$$

$$S = 8,32\%$$

Diese Zahlen sind nicht allzuweit entfernt von denjenigen des Diadeninsulfats.



$$C = 32,60\%$$

$$H = 3,26\%$$

$$N = 38,04\%$$

$$S = 8,69\%$$

$$O = 17,39\%$$

Im Pikratsalz dieser Substanz, das aus Wasser auskristallisiert wurde, bestimmte ich den Stickstoffgehalt:

0,2512 g des Pikrats (bei 110° C. bis zum konstanten Gewicht ausgetrocknet) gaben 68,5 ccm N bei 21° C. und 749 mm Hg, was 0,076823 g N = 30,58% entspricht.

Das Adeninpikrat (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH) muß 30,76% Stickstoff enthalten. Die wässrige Lösung des Sulfats dieser Substanz wird durch Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, Brückes Reagens und ammoniakalische Silbernitratlösung gefällt. Die Substanz gibt weder die Murexidprobe noch die Reaktion von Weidel.

Auf Grund der angeführten Tatsachen kann man den Schluß ziehen, daß die untersuchte Substanz mit dem Adenin identisch ist.

