

## Zur Methylierung des Clupeins.

Von

F. Rogoziński (Krakau).

---

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. August 1912.)

---

Bei ihren Untersuchungen über die Einwirkung von Jodmethyl auf Casein haben Skraup und Krause<sup>1)</sup> beobachtet, daß die Methylierung eine tiefgreifende Veränderung des Eiweißmoleküls herbeiführt. «Die Hydrolyse zeigte, daß aus dem methylierten Casein, Tyrosin und Lysin überhaupt nicht, Histidin und Arginin, wenn überhaupt, so in viel geringeren Mengen zu gewinnen sind als aus dem Casein selbst . . . . . Glutaminsäure und Leucin wurden aber in sehr erheblicher Menge erhalten.»

Es scheint daher, daß die basischen Bausteine des Eiweißmoleküls bei der Methylierung besonders stark getroffen werden. Es war von Interesse, festzustellen, wie sich in dieser Hinsicht die an basischen Bausteinen besonders reichen Protamine verhalten.

Ich habe daher, einer Anregung von Herrn Professor Dr. A. Kossel folgend, einige vorläufige Versuche über die Einwirkung der Methylierung auf Clupein ausgeführt. Statt des von Skraup benutzten Jodmethyls wurde dabei, nach dem Vorgange von Novak,<sup>2)</sup> Dimethylsulfat in Anwendung gebracht, wodurch es ermöglicht wurde, die Methylierung bei Zimmertemperatur auszuführen. Dies ist insofern von Bedeutung, als die Untersuchungen von A. Kossel und F. Weiss erwiesen haben, daß das Alkali bei höherer Temperatur auch ohne Lösung der Peptidbindung eine Abspaltung der Amidgruppe des Ar-

ginins bewirken kann. Bei meinen Versuchen war diese Fehlerquelle ausgeschlossen.

Als Ausgangsmaterial benutzte ich nach A. Kossel dargestelltes Clupeinsulfat aus Herings sperma. Es wurde durch Abscheidung als Öl und nachträgliche Überführung in das Pikrat gereinigt. Die Einzelheiten der ausgeführten Versuche mögen im folgenden beschrieben werden.

### Versuch I.

3 g Clupeinsulfat wurden in wenig Wasser unter Zusatz von etwas Natronlauge gelöst; sodann wurden sie mit 10 g Dimethylsulfat und 3,2 g Natronhydrat, letzteres in 10 ccm Wasser gelöst, abwechselnd portionenweise unter beständigem Schütteln und zeitweiser Kühlung mit Leitungswasser versetzt. Eine neue Portion des Reagens wurde stets erst zugesetzt, nachdem die vorige in der Lösung nicht mehr sichtbar war. Das Reaktionsgemisch blieb sodann bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang stehen, wobei die Reaktion durch Zusatz von Natronlauge stets alkalisch gehalten wurde. Nach 24 Stunden wurde die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure gegen Lackmus neutral gemacht, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und die neutrale Lösung mit gesättigter Lösung von Natriumpikrat vollständig ausgefällt. Das Pikrat wurde mit Schwefelsäure zerlegt, mit Äther von der Pikrinsäure befreit, die Lösung mit Barytwasser neutral gemacht und auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingeengt. Die Lösung gab sehr starke Biuretreaktion in der Kälte mit rein violetter Farbe. Der Sirup wurde in 30 ccm 33%iger Schwefelsäure gelöst und 14 Stunden unter dem Rückflußkühler gekocht. Die hydrolysierte Lösung wurde mit Wasser verdünnt, filtriert und heiß mit einer heißen konzentrierten Lösung von Barythydrat bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Der Niederschlag von Baryumsulfat wurde abgesaugt, ausgekocht und gut ausgewaschen, Filtrat und Waschwässer wurden vereinigt und auf 250 ccm eingeengt. In zwei Proben zu 10 ccm wurden Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt, welche ergaben:

10 ccm entsprachen 15,15 ccm  $n_{10}$ -Säure und enthielten somit 21,21 mg N. Die übrige Lösung (230 ccm) wurde nach dem Silber-Barytverfahren ausgefällt, der Arginin-Silberniederschlag wie gewöhnlich behandelt, mit Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Schwefelsäure zerlegt, die argininhaltige Lösung auf 250 ccm eingeeengt. In zwei Proben der Lösung zu 20 ccm wurden Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt. 20 ccm entsprachen 10,5 ccm  $n_{10}$ -Säure, enthielten somit 14,70 mg N.

Die 3 g des zur Methylierung verwendeten Clupeinsulfats enthielten nach der Berechnung 713,00 mg Gesamtstickstoff. Das als Pikrat isolierte Methylierungsprodukt gab nach der Hydrolyse 530,20 mg Gesamtstickstoff.

In 487,83 mg dieses Gesamtstickstoffs wurden 183,75 mg Argininstickstoff gefunden. Somit enthält das Methylierungsprodukt 37,67% des Gesamtstickstoffs als Argininstickstoff.

## Versuch II.

Es wurden ebenso wie im vorigen Versuch 3 g Clupeinsulfat verwendet. Das ganze Arbeitsverfahren blieb genau das gleiche. 10 ccm der hydrolysierten auf 250 ccm gebrachten Lösung ergaben folgende Analysenzahlen:

10 ccm entsprachen 11,70 ccm  $n_{10}$ -Säure und enthielten somit 16,38 mg N.

20 ccm der auf 250 ccm gebrachten Argininlösung entsprachen 6,20 ccm  $n_{10}$ -Säure und enthielten somit 8,68 mg N. Es waren danach enthalten:

Im Ausgangsmaterial 713,00 mg Gesamtstickstoff.

Im hydrolysierten Methylierungsprodukt 409,50 mg Gesamtstickstoff.

376,74 mg dieses Gesamtstickstoffs enthielten 108,50 mg Argininstickstoff, somit 28,79%.

Die nach den Stickstoffbestimmungen übrig gebliebene Argininlösung wurde mit Barytwasser von der Schwefelsäure, mit Kohlensäure von überschüssigem Barythydrat befreit, zur Trockne eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen, vom

Baryumcarbonat abfiltriert und mit alkoholischer Pikrolonsäure versetzt. Das in krystallinischen Knollen ausgeschiedene Produkt wurde mit wenig kaltem Wasser gewaschen und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Es schmolz scharf und glatt bei  $225^{\circ}$  (unkorr.), was mit den Angaben Steudels über den Schmelzpunkt des Argininpikrolonats genau übereinstimmt.

### Versuch III.

Es wurden in diesem Versuche, der als Kontrolle dienen sollte, 2 g Clupeinsulfat genau in der oben beschriebenen Weise der Spaltung unterworfen und der Gesamtstickstoff sowie der Argininstickstoff in den Spaltungsprodukten bestimmt.

10 ccm der auf 250 ccm gebrachten hydrolysierten Lösung entsprachen 12,40 ccm  $n_{10}$ -Säure und enthielten somit 17,36 mg N.

20 ccm der auf 250 ccm gebrachten Argininfraktion entsprachen 20,10 ccm  $n_{10}$ -Säure und enthielten somit 28,14 mg N.

Im Ausgangsmaterial war (nach der Berechnung) 475,3 mg Stickstoff vorhanden.

In der hydrolysierten Lösung war 434 mg Gesamtstickstoff gefunden worden.

399,28 mg dieses Gesamtstickstoffs enthielten 351,75 mg Argininstickstoff, somit 88,09%.

Wie aus den oben mitgeteilten Zahlen zu ersehen ist, scheint das Clupein bei der Methylierung eine tiefe Veränderung zu erleiden. Während das ursprüngliche Clupeinsulfat ca. 88% des Gesamtstickstoffs in der Form von Argininstickstoff enthält, bildet in dem unter der Einwirkung von Dimethylsulfat und Natronlauge entstandenen, als Pikratverbindung isolierten Produkt der Argininstickstoff nur noch 29—38% des Gesamtstickstoffs. Die Ursache des großen Unterschieds, welcher zwischen den Ergebnissen der beiden ausgeführten Versuche besteht, muß durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden. Jedenfalls scheinen die Versuche zu beweisen, daß unter der Einwirkung des angewendeten Verfahrens ein starker Rückgang des Arginins im Clupeinmolekül stattfindet. Dieses Ergebnis steht mit den Beobachtungen von Skraup und Krause über die Ein-

wirkung von Jodmethyl auf Casein in bestem Einklang. Die weitere Untersuchung der Frage, zu der die vorliegende Arbeit nur einen kleinen Beitrag liefern sollte, wird im hiesigen Laboratorium unternommen.

### Literatur.

1. Zd. H. Skraup und E. Krause, Monatshefte für Chemie. Bd. 30, S. 447, 1909.
  2. J. Novak, Ber. d. d. chem Ges., Bd. 45, S. 834, 1912.
  3. H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 219, 1902/03.
-