

# Untersuchungen über Salmin<sup>1)</sup>.

Von

Dr. Mathilde Nelson-Gerhardt.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1919.)

## Allgemeiner Teil.

Goto<sup>2)</sup> kam bei seinen im Jahre 1902 im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß bei der Hydrolyse des Clupeins eine Abnahme des Säurebindungsvermögens stattfindet. Da diese Erscheinung für die Kenntnis des Protaminmoleküls wichtig erschien, habe ich, auf Anregung von Herrn Professor A. Kossel, sie auch bei einem andern Protamin, dem Salmin, geprüft und bestätigt gefunden (s. unten). Meine weiteren, unten mitgeteilten Untersuchungen waren darauf gerichtet, das Zustandekommen dieser Erscheinung zu erklären.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Professor Kossel für die Ratschläge, mit denen er mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützte, meinen besten Dank auszusprechen.

Eine Zunahme der Acidität bei der Hydrolyse, besonders bei der enzymatischen Spaltung, ist auch bei andern Proteinen<sup>3)</sup> beobachtet worden. Auf den ersten Blick erscheint diese Tatsache schwer verständlich, wenn man annimmt, daß die Amidosäuren im Proteinmolekül nach dem bekannten Schema der Peptide miteinander vereinigt sind; denn es muß doch bei der

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen sind mit Unterstützung der Akademie der Wissenschaften in Heidelberg (Stiftung Lanz) ausgeführt worden.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 37, S. 94 (1902).

<sup>3)</sup> Sörensen. Ergebnisse der Physiologie 1912, hier auch die übrige Literatur.

Hydrolyse auf jede Carboxylgruppe auch eine Amidogruppe in Freiheit gesetzt werden. Nun hat Sørensen für diese auffällige Erscheinung folgende Erklärung gegeben<sup>1)</sup>: Die Peptidbindung tritt bei saurer Reaktion mit der Ketoform  $-\text{CO}-\text{NH}-$  auf, sie wird hingegen mit wachsender Alkalität immer mehr in die als schwache Säure wirkende Enolform  $-\text{C}(\text{OH})=\text{N}-$  umgewandelt. Diese Eigenschaft soll sich nicht bei allen, sondern nur bei den „peripheren“ Peptidbindungen des großen Eiweißmoleküls zu erkennen geben. Bei der enzymatischen Proteolyse sollen nun infolge der fortschreitenden Teilung des Proteinmoleküls immer mehr Peptidbindungen in die peripherische Lage austreten, und somit soll das Basenbindungsvermögen immer größer werden.

Wenn nun mit der weitergehenden Hydrolyse ein völliger Zerfall der Peptide in die Aminosäuren eintritt, so verschwindet natürlich die enolfähige Atomgruppierung, auf welcher dieser ganze Vorgang beruht, und die Acidität geht wieder zurück.

Diese Theorie ist von Henriques und Sørensen<sup>2)</sup> sowie von andern Forschern an einzelnen Beispielen bestätigt worden und meine unten angeführten Versuche am Glycinanhydrid sowie am Leucylglycin (Spezieller Teil S. 274) stimmen ebenfalls damit überein.

Wenn diese Theorie zur Erklärung der von Goto am Clupein beobachteten Alkaleszenzabnahme bzw. Säurebildung dienen soll, so muß zunächst der Nachweis erbracht werden, daß die Hydrolyse teilweise auf der Peptidstufe stehen geblieben war. Ob dies bei den Versuchen von M. Goto wirklich der Fall gewesen ist, möge dahingestellt bleiben — bei meiner Versuchsanordnung, die sich wesentlich von der Gotos unterschied, und das Salmin betraf, während Goto mit Clupein arbeitete, waren in der Tat Peptide der Monoamidosäuren vorhanden (Spezieller Teil 4). Auch konnte ich nachweisen, daß bei einer Vervollständigung der Hydrolyse durch Zersetzung der Peptide ein Rückgang der Acidität eintrat (Spezieller Teil 4e, S. 278).

<sup>1)</sup> Sørensen l. c.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 63, S. 27 (1909).

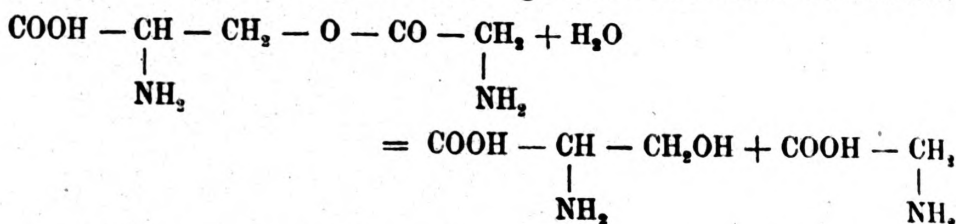
Dieser Befund bestätigte zwar die Annahme, daß die Erklärung Sörensens auf diesen Fall anwendbar war, die quantitativen Verhältnisse zeigten jedoch, daß noch eine andere Ursache für die Säurebildung vorhanden sein mußte. Nach Sörensens Theorie müßte ja die Abnahme der Alkaleszenz auf die Entstehung saurer Gruppen der Peptide zurückzuführen sein. Diese Peptide waren bei meinen Versuchen nur in dem Monoaminosäureanteil des Protaminmoleküls nachzuweisen. Es müßte also die Acidität dieses Anteils mit der Alkaleszenzabnahme des Ganzen gleichwertig sein. Dies ist aber nicht der Fall; denn die Alkaleszenzabnahme des Ganzen war siebenmal so groß wie das Basenbindungsvermögen der bei der Hydrolyse entstandenen Monoamidosaurepeptide [Spezieller Teil 4, Zweite Versuchsreihe d), S. 281]. Diese Acidität der bei diesen Versuchen gefundenen Monoamidosaurepeptide reicht also bei weitem nicht aus, um die Alkaleszenzabnahme des ganzen Protaminmoleküls bei der Hydrolyse zu erklären.

Die Vermutung, daß bei der Hydrolyse des Salmins eine Säure, die der Untersuchung bisher entgangen ist, etwa eine zweibasische Monoaminosäure entsteht und die saure Reaktion verursacht, veranlaßte mich zu einer genaueren Untersuchung der durch das Silberbarytverfahren fällbaren Fraktion. Aber auch hier war keine derartige Substanz nachzuweisen.

Ebensowenig kann in dem Freiwerden der Carboxylgruppe des Serins aus der Peptidbindung die Ursache des Alkaleszenzrückganges gefunden werden, denn ich habe mich durch besondere Versuche davon überzeugt, daß das Serin keine genügend sauren Eigenschaften besitzt (Spezieller Teil 3, S. 275).

Der negative Ausfall dieser Versuche lenkt die Aufmerksamkeit auf eine andere Möglichkeit, nämlich auf eine esterartige Bindung der Hydroxylgruppe des Serins mit der Carboxylgruppe einer Aminosäure. Eine einfache Überlegung ergibt, daß der hydrolytische Zerfall einer derartigen Verbindung, welche zwei Aminogruppen und eine Carboxylgruppe enthalten würde, die ursprünglich vorhandene Alkaleszenz zum Verschwinden bringen muß, ohne daß dabei eine Substanz von ausgeprägt sauren Eigenschaften entsteht. Überträgt man diesen

Vorgang auf die einfachen Verhältnisse eines Serin-Glykokoll-esters, so kann man ihn durch folgendes Formelbild darstellen:



Das oben erwähnte Vorkommen von Peptiden in dem Monoamidosäureanteil der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Salmis wurde in folgender Weise nachgewiesen. Zunächst entfernte ich das Arginin durch wiederholte Fällung mit der Silberbarytmethode. Den Rückstand, welcher die Monoamidosäuren: Valin, Serin und Prolin sowie die Peptide enthalten mußte, prüfte ich in zweifacher Weise auf Peptide.

1. Es wurde die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs der Monoamidosäurefraktion mit dem Gesamtstickstoff dieser Fraktion verglichen. Das Verhältnis des ersteren zum letzteren betrug 3 : 4. Hiernach müßte nach der ersten, minder tiefgreifenden Hydrolyse noch ungefähr der vierte Teil des gesamten Stickstoffes dieser Fraktion in der Peptidverkettung festgelegt sein (Spezieller Teil 4 b, S. 277 und 279). Nun wurde ein Teil dieser Reaktionsmasse einer weitergehenden Hydrolyse unterworfen und die Formoltitrierung wiederholt. Das Verhältnis des formoltitrierbaren Stickstoffes zum Gesamtstickstoff hatte sich jetzt in der Weise geändert, daß beide Zahlen sich einander näherten. Das Verhältnis war jetzt ungefähr 6,4 : 7 (Spezieller Teil 4 e, S. 282).

2. Es wurde das Molekulargewicht des Monoamidosäureanteils nach der Gefriermethode festgestellt.

Nach früheren Untersuchungen von A. Kossel und H. D. Dakin besteht das Gemisch dieser Monoamidosäuren aus

4,3 Teilen Valin (M.G. = 117)

7,8 Teilen Serin (M.G. = 101)

11 Teilen Prolin (M.G. = 115)

Gefunden wurden in dem Gemisch in drei Versuchen (Spezieller Teil 4 d, S. 280) folgende Zahlen:

1) 130

2) 120,4

3) 121,4.



Das gefundene Molekulargewicht ist also höher als die Molekulargewichte von jedem der drei Bestandteile.

Für sich allein würden diese Bestimmungen keinen überzeugenden Beweis für das Vorhandensein von Peptiden liefern, da der Unterschied der Molekulargewichte nicht bedeutend ist. Im Zusammenhang mit den Formoltitrierungen, mit denen sie im Endergebnis übereinstimmen, verdienen sie aber Beachtung.

Der Nachweis der Monoaminosäurepeptide führt zu dem Schluß, daß in dem ursprünglichen Salminmolekül mindestens zwei Monoaminosäuren miteinander direkt verkettet sind.

Dieses Ergebnis verdient vom Standpunkt früherer Untersuchungen über den Bau des Protaminmoleküls Beachtung. Pringle<sup>1)</sup> teilte das Gemisch der nächsten hydrolytischen Spaltungsprodukte des Clupeins, der „Protone“, in fünf verschiedene Fraktionen und fand in allen dieselbe Zusammensetzung, welche auch in dem ursprünglichen Clupein vorhanden ist, nämlich 2 Moleküle Arginin auf je 1 Molekül einer Monoamidosäure. A. Kossel und H. Pringle zogen hieraus den Schluß, daß in dem Clupein eine gleichmäßige Verteilung der Argininmoleküle und der Monoaminosäuremoleküle vorhanden ist. Eine solche Verteilung kann natürlich in verschiedener Weise stattfinden. Zum Beispiel könnte man annehmen, daß je zwei zusammenhängende Argininmoleküle mit einem Monoaminosäuremolekül regelmäßig abwechseln. Die strenge Durchführung dieser letzteren Annahme, welche von A. Kossel und H. Pringle zunächst erörtert worden ist, wird aber unmöglich, wenn eine Verkettung der Monoaminosäuremoleküle untereinander nachgewiesen wird.

## Spezieller Teil.

### 1. Darstellung des Salmins.

Das für meine Versuche benutzte Clupein und ein Teil des Salmins waren im hiesigen Institut nach der früher von A. Kossel beschriebenen Methode aus den Testikeln des Herings bzw. des Rheinlachs dargestellt worden. Ein anderer Teil des Salmins wurde aus getrockneter Spermamasse von

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 49, S. 301 (1906).

*Oncorhynchus Tschawytscha* (aus dem Sacramento river in Kalifornien) gewonnen. Nach den Untersuchungen von A. Kossel<sup>1)</sup> ist in den beiden genannten Spezies dasselbe Protamin: „Salmin“ enthalten. Da das Protamin dieses Präparats infolge der längen Aufbewahrung in eine schwer lösliche Form oder in eine festere Verbindung mit andern Bestandteilen der Spermien übergegangen war, so ließ es sich durch das gewöhnliche Verfahren nur langsam extrahieren. Ich habe daher ein neues Verfahren ausgearbeitet, bei welchem ich teilweise auch Erfahrungen von Schmiedeberg<sup>2)</sup> und von Malenük<sup>3)</sup> zu Hilfe zog.

100 g des getrockneten, mit Alkohol und Äther ausgekochten feingepulverten und gebeutelten Spermas von *Oncorhynchus* werden mit einer Lösung von 100 g Kupferchlorid in 1 l Wasser im Brütoven bei 37° unter öfterem Umschütteln digeriert. Nach drei Tagen wird die Reaktionslösung herausgenommen, die über dem Sperma stehende Flüssigkeit vorsichtig auf eine Nutsche gegossen und abgesaugt, der Rückstand dreimal mit Wasser aufgeschlemmt und schließlich auf der Nutsche abfiltriert und so lange gewaschen, bis das Filtrat mit konz. Natriumpikratlösung keinen merklichen Niederschlag mehr gibt.

Die vereinigten Filtrate werden unter Umrühren mit so viel konz. wäßriger Natriumpikratlösung versetzt, bis der gelbe Niederschlag von Salminpikrat sich gut zusammenballt und schnell zu Boden setzt. Er wird abfiltriert, mit wenig Wasser, dem einige Kubikzentimeter der Natriumpikratlösung zugesetzt werden, gewaschen und noch feucht in Aceton unter Erwärmen gelöst, wobei vorsichtig so viel Wasser zugesetzt wird, bis eine klare Lösung entsteht<sup>4)</sup>. Nach Zusatz des halben Volumens Alkohol wird unter fleißigem Umrühren tropfenweis 20%ige Schwefelsäure zugefügt, bis kein weiterer Niederschlag mehr ent-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 88, S. 163 (1913).

<sup>2)</sup> Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmak. Bd. 43. S. 57 (1899).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 57, S. 99 (1908).

<sup>4)</sup> Manchmal bleibt die Lösung durch schleimige Aggregate getrübt. Ist ein Abfiltrieren nicht möglich, muß man die Lösung so, wie sie ist, verarbeiten. Durch die späteren, häufigen Umfällungen des Salminsulfats wird die Substanz noch genügend gereinigt.

steht. Hierbei muß man vorsichtig verfahren, weil das auf diese Weise gefällte Salminsulfat im Überschuß löslich ist und weil zuviel Schwefelsäure den Niederschlag schmierig macht. Die über dem sich gut absetzenden, leicht schmierigen, gelblichen Niederschlag stehende Flüssigkeit wird durch ein Filter gegossen und der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt, wodurch er so körnig und hart wird, daß er sich leicht mit einem unten breitgedrückten Glasstab zerreiben läßt. Man dekantiert ihn mehrmals mit Alkohol, dann mit Äther, filtriert ab und wäscht mit Äther, bis das Filtrat wasserklar und farblos ist. Das im Exsikkator vom Äther befreite Salminsulfat wird in Wasser gelöst, mit einer salzsauren Pepsinlösung versetzt (auf ca. 10 g Salminsulfat kommen 250 ccm Wasser, 0,1 g käufliches Pepsin und 0,5 g HCl) und 24 Stunden im Brütschrank bei 37° verdaut. Aus der mit Soda neutralisierten Verdauungsflüssigkeit wird das Protamin als Pikrat mit konz. wäbriger Natriumpikratlösung gefällt, durch Lösen des Niederschlags in Aceton und Fällern mit 20%iger Schwefelsäure in das Sulfat übergeführt, das wie oben angegeben durch Waschen mit Alkohol und Äther in feste Form gebracht wird. Durch Lösen in Wasser und Ausfällen mit Alkohol und Äther wird das Salminsulfat gereinigt, und zwar wird die Umfällung so oft wiederholt, bis der Niederschlag feinkörnig und weiß geworden ist. Nach dem Trocknen muß er eine weiße Masse geben, die leicht zu pulvern ist.

Aus 100 g trockenem Sperma wurden nach diesem Verfahren etwa 10 g Salminsulfat erhalten.

## 2. Feststellung der Alkaleszenzabnahme des Salmins bei der Hydrolyse.

### a) Ausführung der Hydrolyse.

Um die Zeit der Hydrolyse zu verkürzen (eine Hydrolyse unter normalem Druck dauert mindestens 10 Stunden), wurde das Protamin in schwefelsaurer Lösung unter Druck zersetzt. Als Optimum resultierten aus zahlreichen Versuchen folgende Versuchsbedingungen:

Das Protaminsulfat wurde in verdünnter Schwefelsäure gelöst, so daß die Lösung in Bezug auf Protaminsulfat 10% ig,

in Bezug auf Schwefelsäure ungefähr 6 gewichtsprozentig war. Ich brachte diese Lösung in eine Platinschale, welche durch eine darübergestülpte größere Platinschale vor Verunreinigungen geschützt war, und setzte sie im Autoklaven während 2 Stunden einer Temperatur von  $141^{\circ}$  und einem Überdruck von einer Atmosphäre aus. Die zersetzte Lösung gab keine Biuretreaktion mehr und entwickelte in alkalischer Lösung kein Ammoniak. Die dabei entweichenden, schwach alkalisch reagierenden Dämpfe konnten dem Geruch nach nicht auf Ammoniak, sondern auf Spuren von Pyrrolidin zurückgeführt werden.

Höhere Temperaturen ( $166$ — $169^{\circ}$ ) zersetzten das Arginin, was an der Abspaltung von Ammoniak erkannt werden konnte; niedrigere Temperaturen ( $122$ — $130^{\circ}$ ) spalteten das Protamin nicht vollkommen, da die Reaktionslösung nach der Zersetzung noch Biuretreaktion gab.

Eine in Bezug auf das Protaminsulfat höherprozentige Lösung wurde unregelmäßig zersetzt, da die Reaktionslösung nach dem Erhitzen sowohl die Biuretreaktion gab, als auch Ammoniak entwickelte.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

$2\frac{1}{2}$  g Protaminsulfat wurden unter Zusatz von  $7\frac{1}{2}$  ccm 20%iger Schwefelsäure in Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst, die Lösung auf 250 ccm aufgefüllt und in zwei Teile geteilt. 100 ccm wurden in einer Platinschale auf dem Wasserbad auf 10 ccm eingengt und dann im Autoklaven 2 Stunden bei  $141^{\circ}$  und dem Überdruck einer Atmosphäre gehalten. Die wenig gelb gefärbte Reaktionslösung wurde auf 100 ccm aufgefüllt und gleichzeitig mit der Ausgangslösung der Titration unterworfen. Es wurde  $n_{/10}$ - $H_2SO_4$  und  $n_{/10}$ -NaOH verwendet; als Indikatoren dienten Phenol- und Thymolphthalein.

#### b) Ergebnisse.

Die zersetzte Lösung hatte gegenüber der Ausgangslösung an Acidität zugenommen. Die Resultate stimmten zwar nicht absolut quantitativ überein, doch näherten sich die Werte immerhin in befriedigender Weise.



Die Versuche mit Clupeinsulfat ergaben eine deutlich erkennbare Aciditätszunahme, doch sind die Resultate, weil die Optimalbedingungen noch nicht gefunden waren, bei diesem Material nicht so gut wie die bei der Zersetzung des Salmin-sulfats erhaltenen.

Versuch 1a.  $2\frac{1}{2}$  g Salminsulfat aus Rheinlachs wurden unter Zusatz von  $7\frac{1}{2}$  ccm 20%iger Schwefelsäure in Wasser gelöst und die Lösung auf 250 ccm aufgefüllt. 100 ccm wurden auf 10 ccm eingedampft und im Autoklaven zersetzt ( $135^{\circ}$ ,  $\frac{3}{4}$  Atm. Überdruck). Nach Auffüllung auf 100 ccm wurde titriert.

Vor der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm 17,18 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH; 20 ccm 34,30 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Nach der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm 17,68 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH; 20 ccm 35,53 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

(Die Lösung zeigte nach der Zersetzung ganz schwache Biuretreaktion.)

Versuch 1b. Ein Versuch unter genau denselben Bedingungen ergab:

Vor der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm 17,35 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH; 20 ccm 34,74 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Nach der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm 18,05 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH; 20 ccm 36,10 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Die Titrationsen wurden mit Phenolphthalein als Indikator ausgeführt, und zwar wurde auf schwach rosa titriert.

Versuch 2.  $2\frac{1}{2}$  g Salminsulfat aus Oncorhynchus wurden unter Zusatz von  $7\frac{1}{2}$  ccm 20%iger Schwefelsäure in Wasser unter Erwärmen gelöst und auf 250 ccm aufgefüllt. 100 ccm wurden in einer Platinschale auf 10 ccm eingeeengt und im Autoklaven bei  $140^{\circ}$ , einem Überdruck von 1 Atm., 2 Stunden gehalten. Die Zersetzungsflüssigkeit wurde danach auf 100 ccm aufgefüllt und zugleich mit der Ausgangslösung titriert.

10 ccm verbrauchten mit Phenolphthalein als Indikator:

	vor der Zersetzung	nach der Zersetzung
(rosa)	16,43 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	17,16 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH'
(rot)	16,53 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	17,62 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH

10 ccm verbrauchten mit Thymolphthalein als Indikator:

	vor der Zersetzung	nach der Zersetzung
(hellblau)	16,63 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	18,07 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH
(stark blau)	16,77 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	18,66 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH

Die Werte stimmen mit den am Protamin des Rheinlachs gefundenen Werten überein.

### 3. Verhalten von Glycinanhydrid und Leucylglycin bei der Hydrolyse. Verhalten des Serins.

#### Glycinanhydrid.

2,5 g Glycinanhydrid wurden unter Zusatz von  $7\frac{1}{2}$  ccm 20% iger  $H_2SO_4$  in  $H_2O$  gelöst, die Lösung auf 250 ccm aufgefüllt, 100 ccm auf 10 ccm eingedampft und im Autoklaven zersetzt (2 Stunden bei  $141^\circ$ , 1 Atm. Überdruck. Als Indikator diente Phenolphthalein). Die Reaktionslösung wurde auf 100 ccm aufgefüllt und titriert.

10 ccm verbrauchten:

	vor der Zersetzung	nach der Zersetzung
I)	16,30 ccm	17,44 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH
II)	16,30 ccm	17,40 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH

Wäre Glycinanhydrid völlig, d. h. zu dem schwach sauren Glykokoll aufgespalten worden, so hätte man eine ganz schwache Aciditätszunahme erwarten dürfen. Die starke Aciditätszunahme ist auf Bildung des stark sauren Glycylglycins zurückzuführen.

#### d, l-Leucylglycin.

2,5 g synthetisches d, l-Leucylglycin wurden, ebenso wie beim Glycinanhydrid angegeben, der Zersetzung im Autoklaven unterzogen.

Vor der Zersetzung verbrauchten mit Thymolphthalein als Indikator bis zu stark blauer Farbe titriert:

10 ccm            21,6 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Nach der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm            20,8 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Die Aciditätsabnahme entspricht nahezu dem durch die Ausspaltung erwarteten theoretischen Wert.

0,1 g Leucylglycin verbrauchten bei der Titration  
5,32 ccm  $n/_{10}$ -NaOH.

Aus 0,1 g Leucylglycin müssen bei der Spaltung  
0,03994 g Glykokoll und  
0,0697 g Leucin

entstehen.

0,0399 g Glykokoll verbrauchten bei der Titration  
2,02 ccm  $n/_{10}$ -NaOH,

0,0697 g Leucin verbrauchten bei der Titration  
2,38 ccm  $n/_{10}$ -NaOH,

zusammen: 4,40 ccm  $n/_{10}$ -NaOH.

Wird also 0,1 g Leucylglycin gespalten, so muß eine  
Aziditätsabnahme von 5,32 – 4,40 ccm  $n/_{10}$ -NaOH eintreten  
= 0,92 ccm.

Gefunden wurde eine Abnahme von 0,8 ccm.

#### Serin.

Um zu untersuchen, ob die Aciditätszunahme, die bei der  
Zersetzung des Salmins beobachtet wurde, auf das aus einer  
Peptidbindung freiwerdende Serin zurückzuführen sei, mußte  
die Acidität des freien Serins festgestellt werden.

Zu diesem Zwecke wurde die  $\beta$ -Oxy- $\alpha$ -Aminopropionsäure  
nach der Vorschrift von Leuchs und Geiger<sup>1)</sup> dargestellt.  
Das nach mehrmaligem Umkristallisieren farblos kristallisierende  
Produkt schmolz bei 238° (unkorrig.).

Es wurde eine  $n/_{10}$ -Lösung des Serins hergestellt und mit  
 $n/_{10}$ -NaOH unter Benutzung von Phenolphthalein und Thymol-  
phthalein als Indikatoren titriert.

10 ccm  $n/_{10}$ -Serinlösung verbrauchten:

- 0,6 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur schwach roten Färbung,
- 1,2 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur stark roten Färbung,  
wenn Phenolphthalein als Indikator benutzt wurde;
- 4 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur schwach blauen Färbung,
- 8 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur stark blauen Färbung,  
wenn Thymolphthalein angewandt wurde.

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 39, S. 2644 (1906).

Bei der Titration mit Thymolphtalein war der Umschlag äußerst schlecht zu erkennen und die angegebenen Werte dürfen demnach nur als Näherungswerte angesehen werden.

Um nun mit einer Lösung zu arbeiten, die in Bezug auf das Serin prozentual annähernd ebenso zusammengesetzt wäre, wie die in der vorstehenden Arbeit untersuchte Zersetzungsflüssigkeit, wurde eine  $n/_{100}$ -Serinlösung auf ihr Verhalten geprüft.

(In 100 ccm einer  $n/_{100}$ -Serinlösung befinden sich 0,105 g Serin. In 100 ccm der Zersetzungsflüssigkeit müssen nach den bisher bekannten Gewichtsverhältnissen 0,061 g Serin enthalten sein, da in 100 ccm 1 g Salmisulfat waren.)

10 ccm  $n/_{100}$ -Serinlösung verbrauchten:

0,09 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur schwach roten Färbung,

0,3 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur stark roten Färbung

bei Anwendung von Phenolphtalein;

0,6 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur schwach blauen Färbung,

0,8 ccm  $n/_{10}$ -NaOH bis zur stark blauen Färbung,

wenn Thymolphtalein benutzt wurde.

Auch bei dieser Titration können die Werte, die mit Thymolphtalein als Indikator erhalten wurden, nur als Näherungswerte betrachtet werden, da der Umschlag äußerst unscharf war.

Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit den sehr viel höheren Werten der Aciditätszunahme, die bei der Spaltung des Salmis gefunden wurden, so ist sofort klar, daß diese Zunahme nicht nur auf das aus einer Peptidbindung freier werdende Serin zurückzuführen ist.

#### 4. Nachweis der Polypeptide unter den Reaktionsprodukten.

Erster Versuch (Salmin von Rheinlachs).

a) Hydrolyse und Bestimmung der Alkaleszenz.

10 $\frac{1}{2}$  g Salmisulfat wurden in 5 Teilen zu je 2,1 g nach dem oben beschriebenen Verfahren im Autoklaven hydrolysiert. Die Reaktionslösungen zeigten keine Biuretreaktion mehr und entwickelten, alkalisch gemacht, Lackmuspapier schwach bläuende Dämpfe, die nicht nach Ammoniak rochen und höchstwahrscheinlich



scheinlich Spuren von Pyrrolidin enthielten. Harnstoff war nicht nachzuweisen.

2 $\frac{1}{2}$  g des Protaminsulfats wurden nach oben gegebener Vorschrift vor und nach der Zersetzung der Titration unterworfen. Als Indikator wurde Thymolphthalein benutzt.

Vor der Zersetzung verbrauchten:

	schwach blau	stark blau
10 ccm	16,73 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	16,8 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH,

nach der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm	18,1 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	19,4 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH.
--------	-------------------------------	--------------------------------

b) Bestimmung des formoltitierbaren Stickstoffes und des Gesamtstickstoffes in der Aminosäurefraktion.

Der Rest der Reaktionsflüssigkeit wurde nun nach einem Verfahren, welches dem im zweiten Versuch (s. unten!) beschriebenen im wesentlichen entsprach, vom Arginin befreit und die Lösung, welche nur die Monoamidosäuren oder deren Peptide enthalten konnte, auf 100 ccm aufgefüllt, von denen dreimal je 10 ccm einer Formoltitration und einer Kjeldahlbestimmung unterworfen wurden.

### I.

8 g Salminsulfat verarbeitet:

Formoltitration (Indikator: Thymolphthalein):

10 ccm entsprachen 2,61 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH = 7,308 mg N.

Kjeldahlbestimmung:

10 ccm entsprachen 3,70 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH = 10,40 mg N.

### II.

10 $\frac{1}{2}$  g Salminsulfat verarbeitet:

Formoltitration:

10 ccm entsprachen 3,36 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH = 9,408 mg N.

Kjeldahlbestimmung:

10 ccm entsprachen 4,45 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH = 12,26 mg N.

Die unter I und II angeführten Zahlen sind Mittelwerte aus drei gut übereinstimmenden Versuchswerten.

Da die Kjeldahlbestimmung höhere Werte lieferte als die Formoltitrierung, mußte das Vorhandensein von Peptidbindungen angenommen werden. Dies wurde durch folgenden Versuch bestätigt.

Die übrigen 70 ccm der Lösung wurden mit 3 ccm 20% iger Schwefelsäure angesäuert, wobei ein beträchtlicher Niederschlag von Bariumsulfat ausgeschieden wurde. Von diesem Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat auf 100 ccm aufgefüllt. 50 ccm der Lösung wurden nach bekannter Vorschrift im Autoklaven zersetzt und gleichzeitig mit dem Rest der Ausgangslösung titriert. Als Indikator diente Thymolphthalein (auf stark blau titriert; der Farbstoff wurde offensichtlich von den Abbauprodukten verzehrt, so daß sehr schnell gearbeitet werden mußte).

Vor der Zersetzung verbrauchten:

10 ccm 18,4 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH,

nach der Zersetzung:

10 ccm 18,02 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Die Aciditätsabnahme läßt auf Entstehung von Monoamino-säuren aus Polypeptiden schließen. Es konnte weder vor noch nach der Zersetzung Ammoniak oder Harnstoff nachgewiesen werden.

## Zweiter Versuch (Salmin von *Oncorhynchus*).

### a) Trennung der Aminosäuren vom Arginin.

16 g Salminsulfat wurden unter den oben angegebenen Bedingungen in 8 Teilen zu 2 g (10 ccm 6% ige Schwefelsäure, 140°, Überdruck 1 Atm., 2 Stunden) im Autoklaven zersetzt. Die Reaktionslösungen zeigten weder Biuretreaktion, noch entwickelten sie, alkalisch gemacht, Ammoniak. Sie wurden alle vereinigt und mit so viel kochender Silbersulfatlösung (3 mal 14 g Silbersulfat in 1 l Wasser) versetzt, bis eine Tüpfelprobe der Lösung mit Barytlösung einen braunen Niederschlag gab. Die Lösung wurde nach dem Erkalten mit so viel kon-

zentrierter heißer Barytlösung (120 g in 150 ccm Wasser) versetzt (unter Umrühren vorsichtiger Zusatz), bis sie stark alkalisch reagierte. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Seesand und barythaltigem Wasser verrieben, abfiltriert und dieses Verfahren dreimal wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden mit Schwefelsäure angesäuert, mit Schwefelwasserstoff zur Entfernung des überschüssigen Silbers gesättigt, mit Baryt alkalisch gemacht und mit Kohlendioxyd neutralisiert. Der starke, weiße Niederschlag wurde abfiltriert, dreimal mit Seesand und Wasser verrieben und abfiltriert.

Um einer vollständigen Abtrennung des Arginins sicher zu sein, wurde die Silberbarytfällung noch einmal wiederholt. Zu diesem Zweck wurden die Filtrate zur Trockne gedampft, mit Wasser aufgenommen, filtriert, mit Schwefelsäure angesäuert und mit kochender Silbersulfatlösung versetzt. Es entstand sofort ein gelber, schnell braun werdender Niederschlag, der schwefelhaltig war. Da die Reaktion Thioschwefelsäure vermuten ließ, wurde die Probe mit Jod gemacht, die positiv ausfiel. Da die Thioschwefelsäure den Gang des Versuches vorläufig nicht störte, wurde sie unberücksichtigt gelassen, und die ganze Fällung des Arginins mit Silber noch einmal durchgeführt.

b) Bestimmung des Formolstickstoffs und des Gesamtstickstoffs in der Aminosäurefraktion.

Die zuletzt erhaltenen, schwach alkalisch reagierenden Filtrate wurden eingedampft, filtriert, mit Schwefelsäure gegen Azolithminpapier neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden dreimal je 10 ccm einer Formoltitration mit nachfolgender Kjeldahlbestimmung unterworfen.

Formoltitration: 10 ccm verbrauchen 6,05 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,  
entspr. 16,912 mg N.

Kjeldahlbestimmung: 10 ccm verbrauchen 8,07 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,  
entspr. 22,596 mg N.

Das Verhältnis der beiden Zahlen ist dasselbe, wie das bei den ersten Versuchen (S. 277) gefundene, auch hier ist das

Vorhandensein von Peptiden der Monoaminosäurefraktion nachgewiesen.

c) Molekulargewichtsbestimmungen in der Aminosäurefraktion.

Die von den N-Bestimmungen übrig gebliebenen 70 ccm der Lösung wurden mit so viel Schwefelsäure versetzt, daß die Lösung 6% Schwefelsäure enthielt; sie wurde dann zum Sieden erhitzt und vier Tage stehen gelassen. Eine Probe mit Silbernitrat versetzt, gab keinen Niederschlag mehr, ein Beweis, daß die Thioschwefelsäure zerstört war. Nun wurde mit Barytlösung alkalisch gemacht und mit Schwefelsäure genau alles Barium entfernt, so daß die Lösung nur die Aminosäuren enthielt. Sie wurde eingedampft und die Rückstände, die teilweise kristallinische Struktur zeigten, im Vakuum bei 100° getrocknet. Es dauerte sehr lange, bis die hygroskopische Substanz im Wägenerörchen konstant war. Die Substanz betrug 0,9352 g. Da wegen ihrer hygroskopischen Beschaffenheit ein Pulvern und Einbringen in kleine Wägenerörchen nicht möglich war, wurde eine konzentrierte Lösung hergestellt, die mittels einer Wägepipette in das Gefrierrohr zur Molekulargewichtsbestimmung gebracht wurde. Zuvor angestellte Versuche, Glykokoll und Alanin in Lösung zur Molekulargewichtsbestimmung zu verwenden, ergaben gute Resultate.

In einem gut schließenden Wägegglas wurden 0,9352 g Substanz in 10,0094 g H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden drei Molekulargewichtsbestimmungen ausgeführt, die die Werte:

**130**

**120,4**

**121,4**

ergaben.

1. 1,0234 g Lösung ergaben in 10,0094 g Wasser (d. i. 0,0874 g Substanz in 10,9453 g Wasser) eine Depression von 0,116°. Nach der bekannten Formel  $M = \frac{K \cdot 100 S}{\Delta L}$  ergibt sich aus den erhaltenen Werten  $M = 130$ .

2. 2,0797 g Lösung in 10,0094 g Wasser (d. i. 0,1777 g Substanz in 11,9113 g Wasser) ergaben eine Depression von 0,234°. Daraus berechnet sich  $M = 120,4$ .



3. 3,1543 g Lösung in 10,0094 g Wasser (d. i. 0,2695 g Substanz in 12,904 g Wasser) ergaben eine Depression von  $0,325^{\circ}$ . Daraus berechnet sich  $M = 121,4$ .

d) Bestimmung der absoluten Acidität der Aminosäurefraktion.

Die Lösung wurde quantitativ in ein Meßkölbchen gebracht und auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden zweimal je 40 ccm gebraucht, um die absolute Acidität zu bestimmen, und dann wurde der Gesamt-N bestimmt.

40 ccm (entsprechend 0,1078 g Substanz) brauchten, um einen rosa Farbenton mit Phenolphtalein zu geben:

a) 0,48 ccm  $n/_{10}$ -NaOH      b) 0,51 ccm  $n/_{10}$ -NaOH;

um einen roten Farbenton zu geben:

a) 0,74 ccm  $n/_{10}$ -NaOH      b) 0,79 ccm  $n/_{10}$ -NaOH.

Aus diesen Zahlen läßt sich das Verhältnis der Abnahme der Gesamtalkaleszenz zur Zunahme der Acidität des Monoaminosäureanteils ersehen. Die Alkaleszenzabnahme von 0,1 g Salmin-sulfat betrug 0,7 ccm  $n/_{10}$ -Säure. 0,1 g Salmin-sulfat enthält 0,016 g Aminosäuren. Wäre die Alkaleszenzverminderung völlig auf die Aciditätssteigerung des Monoaminosäureanteils der Zer-setzungsprodukte zu beziehen, so müßte 0,016 g der Monoamino-säurefraktion ebenfalls 0,7 ccm  $n/_{10}$ -Alkalilösung entsprechen. Dies ist aber nach obigen Zahlen nicht der Fall, denn es ent-sprechen ungefähr 0,1078 g annähernd 0,5 ccm  $n/_{10}$ -Alkali-lösung (rosa Farbenton mit Phenolphtalein). Die Acidität des Monoaminosäureanteils ist also viel zu gering, um die bei der Hydrolyse des Salmins eintretende Alkaleszenzabnahme zu er-klären.

e) Weitere Zersetzung der Aminosäurefraktion.

Die von den Molekulargewichtsbestimmungen übrig ge-bliebene Lösung wurde auf 200 ccm aufgefüllt:

Je 50 ccm wurden in einer Platinschale mit 6 ccm 20% iger Schwefelsäure auf 20 ccm eingedampft und bei  $140^{\circ}$  und 1 Atm. Überdruck 2 Stunden gehalten.

Nach der Zersetzung wurde die Schwefelsäure durch Baryt

entfernt, von dem Niederschlag abfiltriert und die Lösung gegen Azolithminpapier neutralisiert.

Die Lösung wurde in 4 Teile geteilt, a<sup>1)</sup>, b, c und d.

b verbrauchte bei der Formoltitration 4,38 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,

c " " " " 4,65 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,

d " " " " 4,39 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH.

Thymolphthalein wurde als Indikator angewandt.

Die Lösungen wurden nun nach Kjeldahl zersetzt und der Gesamt-N bestimmt.

b entsprach 4,90 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,

c " 5,30 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH,

d " 4,88 ccm  $\frac{n}{5}$ -NaOH.

Die Formoltitration ergab einen Stickstoffgehalt von:

b = 12,264 mg, c = 13,02 mg, d = 12,29 mg.

Die Kjeldahlbestimmung ergab einen Stickstoffgehalt von:

b = 13,72 mg, c = 14,84 mg, d = 13,76 mg.

Das Verhältnis  $\frac{\text{Gesamtstickstoff}}{\text{Aminostickstoff}}$ , welches in Versuch 4b,

S. 279, gleich  $\frac{22,6}{16,9} = 1,34$  gefunden war, hatte sich somit in-

folge der tiefergreifenden Hydrolyse auf  $\frac{14,1}{12,5} = 1,1$  erniedrigt

— ein weiterer Beweis für das Vorhandensein einer Peptidbindung in der Monoaminosäurefraktion.

<sup>1)</sup> Die Analyse a ging verloren.