XXV.

Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie
zu Straßburg.

205. Über das Thymamin: ein Protamin aus der Thymusdrüse.

Von

Dr. Louis Nelson aus Boston V.-St. A., Assistent am Institut.

Da die Thymusdrüse Nucleinsäure enthält, welche mit der aus Lachsmilch dargestellten identisch ist¹⁾, so war es von großem Interesse, zu untersuchen, ob in dieser Drüse Protamin oder eine dem Protamin entsprechende Base enthalten ist. Für das Protamin von F. Miescher²⁾ aus Lachsmilch gilt als charakteristisch, daß es eine starke Base ist, die wie die Eiweißkörper die Biuretreaktion, nicht aber die Rotfärbung mit Millons Reagens gibt und keinen Schwefel enthält.

Fleroff³⁾ hat unter Kossels Leitung aus der Thymusdrüse das Histon und Parahiston dargestellt. Beide geben aber die Millonsche Reaktion und enthalten Schwefel, das Histon 0,62% und das Parahiston 1,99%. Es sind also keine Protamine in dem Sinn wie das Miescher'sche Protamin.

Es galt vor allem ein Verfahren zu finden, um eine Protaminbase, wenn eine solche in der Thymusdrüse enthalten ist, von den Histonen und anderen Eiweißstoffen zu trennen.

Es hat nahezu zwei Jahre gedauert bis es mir gelang, ein solches Protamin in der Drüse nachzuweisen und ein Verfahren zu seiner Reindarstellung auszuarbeiten.

Die von mir dargestellte dem Protamin der Lachsmilch entsprechende Base, kann in Analogie mit jenem Thymamin genannt werden.

Folgendes Verfahren führte zur Trennung des Thymamins von den Eiweißstoffen, namentlich von dem Histoneiweiß. Das von Blut und Bindegewebe möglichst befreite Drüsengewebe wird fein zerhackt und zerrieben und mit warmem Wasser zu einer schleimigen

1) Archiv f. exp. Path. u. Pharmakol. Bd. 57. S. 309. 1907.

2) Archiv f. exp. Path. und Pharmakol. Bd. 37. S. 100. 1896.

3) Zeitschrift für physiolog. Chem. XXVII p. 308. 1899.

Masse angerührt, dann mit Essigsäure schwach angesäuert und auf dem Wasserbade zur Coagulation der Eiweißstoffe 15—20 Min. lang erhitzt. Nach dem Abkolieren und Abpressen der Flüssigkeit wird die coagulierte Drüsenmasse in derselben Weise wie die Lachsmilch mit einer Lösung von Kupferchlorid behandelt, wobei das Protaminsalzsaures Salz in Lösung geht, während die eiweißartigen Stoffe als Kupferverbindung gelöst werden. Diese Lösung wird mit soviel Natronlange versetzt, daß sie neutral aber nicht alkalisch reagiert, und der dabei entstandene, an Kupfer gebundene eiweißartige Stoffe enthaltene Niederschlag abfiltriert. Beim Eindampfen des klaren kupferhaltigen Filtrates scheiden sich weitere Kupferverbindungen aus. Die Flüssigkeit wird mit Wasser verdünnt, filtriert und wieder eingedampft, wobei sich von neuem Kupferverbindungen von Eiweißstoffen ausscheiden. Das Filtrieren und Eindampfen des Filtrats muß so oft wiederholt werden, bis die in der Flüssigkeit zurückbleibende Substanz mit dem Millonschen Reagens keine Spur einer Rotfärbung mehr gibt. Die Gegenwart des Kupfers stört die Millonreaktion nicht. Ich mußte das Eindampfen und Filtrieren bei den einzelnen Darstellungen 6—20 mal wiederholen, bis es gelang, die Lösung von den Stoffen zu befreien, welche die Millonsche Reaktion gaben.

Diese Lösung wird zur Entfernung von überschüssigem Kupferchlorid nach dem Konzentrieren auf Sirupconsistenz mit Alkohol versetzt und der von letzterem getrennte Niederschlag in Wasser gelöst.

Aus dieser durch Filtrieren geklärten kupferhaltigen Lösung wird das Thymamin unter Ansäuern mit Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Hierbei darf nicht zu viel Phosphorwolframsäure zugesetzt werden und es muß der Niederschlag rasch abfiltriert werden, weil sonst Kali mitgefällt wird das dann nach dem Freimachen der Base nur durch eine neue Fällung mit Phosphorwolframsäure entfernt werden kann. Aus dem chlorfrei gewaschenen Phosphorwolframsäureniederschlag wird die Base in bekannter Weise mit Baryt freigemacht und die Lösung nach der sorgfältigen Entfernung des Baryts durch Kohlensäure mit Salzsäure neutralisiert. Diese Lösung enthält noch ein wenig Kupfer, das durch Schwefelwasserstoff entfernt wird. Das auf dem Wasserbade konzentrierte Filtrat hinterläßt eine gelbe, sirupartige Masse, welche eine starke Biuretreaktion, dagegen keine Rotfärbung mit Millons Reagens gibt, aber regelmäßig noch etwas Schwefel enthält, der bei der Darstellung der Platinchlorhydratverbindung entfernt wird.

Die Reindarstellung des Thymamins gelang zunächst nur in Form der Platinverbindung. Man versetzt die konzentrierte wäss-

rige oder alkoholische Lösung der Substanz mit einem Überschuß von Platinechlorid und fügt dann das mehrfache Volum Alkohol und Äther hinzu und läßt absetzen. Der Niederschlag der Platinverbindung besteht teils aus einer teigigen oder festen, kompakten, teils aus einer flockigen Masse. Diese Massen werden nach dem Abdekantieren und Abfiltrieren des Alkohol-Äthers und Auswaschen mit Alkohol zur Entfernung des überschüssigen Platinechlorids mit soviel Wasser behandelt, daß der lösliche Anteil der Platinverbindung in Lösung gebracht wird. Zu viel Wasser ist zu vermeiden, um die Lösung nicht zu sehr zu verdünnen. Nach dem Filtrieren wird das völlig klare Filtrat wieder mit Alkohol-Äther gefällt und der Niederschlag wieder in wenig Wasser gelöst. Wenn er sich ganz klar ohne Rückstand auflöst, so kann die definitive Ausfällung vorgenommen werden, sonst muß der neuerdings erhaltene Niederschlag nochmals gelöst und umgefällt werden.

Zuletzt wird das in dieser Weise erhaltene Thymaminplatinechlorhydrat mit sehr wenig Wasser angerührt und die unvollständig gelöste Verbindung mit wenig Alkohol versetzt, wobei sie als sirupartige Masse ausfällt, die dann nach dem Abgießen der Flüssigkeit nochmals in derselben Weise behandelt, dann unter Alkohol erhärtet, fein zerrieben und im Vacuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet wird. Die Präparate enthielten noch Spuren von Asche, die aber auf die Ergebnisse der Analysen ohne Einfluß waren und vernachlässigt werden konnten.

Da dieses Trocknen bis zur Gewichtskonstanz viele Wochen in Anspruch nimmt, habe ich die Präparate analysiert, bevor constantes Gewicht erreicht war und habe den Wassergehalt nachträglich bestimmt. Die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl und Dumas gaben übereinstimmende Resultate. Das Platin wurde durch vorsichtiges Verbrennen der Substanz erhalten, mit Wasser ausgewaschen und gewogen. Das Chlor wurde durch Verbrennen der mit Natriumcarbonatlösung versetzten und mit getrockneter Substanz und mäßiges Glühen des Rückstandes als Chlorsilber bestimmt. — Vier verschiedene Präparate wurden dargestellt und analysiert.

Die Analysen ergaben folgende Zahlenwerte:

	I	II	III	IV	V	Mittel
C	29.43	29.48	29.55	29.35	29.65	29.49
H	5.18	5.25	5.02	5.23	4.65	5.06
N	9.64	9.78	—	9.60	9.73	9.68
Pt	21.36	21.24	21.45	21.38	21.58	21.40
Cl	—	23.73	—	23.70	23.49	23.64

Diese Zahlen geben die Formel:

	ber.	gef.
C	29.45	29.49
H	4.95	5.06
N	9.39	9.68
Pt	21.73	21.40
Cl	23.73	23.64

Die Präparate I und IV wurden im Vacuum bei 60° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, wobei das erste einen Gewichtsverlust von 1,94% und das zweite einen solchen von 2,14% erfuhr.

Nach Abrechnung des Wassers erhält man Zahlen, aus welchen die folgende Formel berechnet wird.

	ber.	gef.
C	30.05	30.21
H	4.83	4.84
N	9.59	9.92
Pt	22.18	21.88
Cl	24.22	24.09

Die Zusammensetzung des Thymamins ist demnach:

Um die Eigenschaften des nicht an Platin gebundenen Thymamins kennen zu lernen, stellte ich aus der Platinverbindung das Sulfat dar. Die Entfernung des Platins durch Schwefelwasserstoff gelingt nicht oder nur sehr schwierige. Ich fällte das Thymamin deshalb aus der Lösung der Platinverbindung mit Zusatz von etwas Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure aus. Das Platinechlorid bleibt dabei in Lösung und kann durch sorgfältiges Auswaschen des Niederschlages mit Wasser entfernt werden. Aus der Phosphorwolframsäureverbindung wird die Base durch Barythydrat frei gemacht, die Lösung mit Schwefelsäure genau neutralisiert, auf dem Wasserbade konzentriert und mit Alkohol fraktioniert gefällt. Nach dem Trocknen bildet das Thymaminsulfat wie das Protaminsulfat eine amorphe gummiartige, in Wasser äußerst leicht lösliche Masse.

Die geringe Menge der Substanz gestattete nur eine N- und H_2SO_4 bestimmung. Ich erhielt 15.56% N und 11.74% H_2SO_4 . Es handelt sich nach diesen Zahlen um ein basisches Sulfat, etwa von folgender Zusammensetzung

ber. gef.

N 15.92 15.56

H₂SO₄ 11.12 11.74

In einem anderen Präparat wurde, ohne es zu trocknen, nur das Verhältnis von N und H₂SO₄ bestimmt. Es hatte annähernd die gleiche Zusammensetzung, wie jenes. Gefunden wurden 0.0287 N, welches für das obere Verhältnis von

0.0200 H₂SO₄ verlangen: gefunden wurden 0.0212 H₂SO₄.

Daß das Thymamin ein Protamin, wie das Lachsprotamin, nur von anderer Zusammensetzung ist, ergibt sich aus dem bei seiner Darstellung angeführten Umstand, daß es durch Kochen aus der Thymusdrüse nicht entfernt wird, während es bei Behandlung der abgekochten Drüse mit Kupferchlorid bei gewöhnlicher Temperatur leicht als salzsaures Salz in Lösung geht. Es ist demnach in der Drüse an Nucleinsäure gebunden. Auch darin stimmt es mit dem Lachsprotamin überein, daß es Nucleinsäure aus ihrer neutralen oder schwachsauren Lösung in Alkalien fällt. Nach diesen Resultaten steht also das Vorkommen der Nucleinsäure in der Thymusdrüse und wohl in allen Organen der Warmblüter im Einklang mit ihrem Zustand in dem Fischsperma.