

bausteinen¹ mit der Methode der Papierchromatographie noch Threonin und Isoleucin, wenn auch in geringeren Mengen, als Bausteine nachgewiesen und daß weiterhin nach Einwirkung von Dinitrofluorbenzol auf das untersuchte Clupeinpräparat sowohl Prolin wie Serin als amino-endständige Bausteine gekennzeichnet werden konnten.

Die Untersuchung eines von uns aus dem Rohclupein durch Umscheidung aus konzentrierter wässriger Lösung in der Kälte bis zu konstanter Höhe des Quotienten $N:NH_2 = 125$ gereinigten Clupeinpräparates, das den Hauptanteil (etwa 70%) des Rohclupeins darstellt², ergibt demgegenüber die folgenden Befunde:

1. Das Präparat enthält zufolge der papierchromatographischen Analyse neben Arginin nur die 4 Monoaminosäuren Serin, Valin, Alanin und Prolin, und zwar die letzteren in dem schon früher³ festgestellten molekularen Verhältnis von 2:1:1:1; weder Isoleucin noch Threonin sind darin auch nur in Spuren nachweisbar.

2. Die Analyse der Spaltprodukte nach Einführung des Dinitrophenylrestes in unser Clupein ergibt als einzige substituierte Aminosäure Prolin; neben dem allein gebildeten Dinitrophenylprolin ist auch papierchromatographisch kein Dinitrophenylserin nachzuweisen. Prolin stellt also in unserem Präparat die einzige amino-endständige Aminosäure dar.

Aus diesen Befunden insgesamt ergeben sich die folgenden Schlußfolgerungen:

Durch die von uns vorgenommene Fraktionierung des Rohclupeins auf Grund des Gehaltes an Aminostickstoff gelingt es, die Hauptkomponente desselben, mit endständigem Prolin, die ja durch den niedrigsten Gehalt an Aminostickstoff ausgezeichnet ist, frei von den anderen Komponenten des ursprünglichen Mischstoffs⁴ zu erhalten. Das von FELIX und Mitarbeitern untersuchte, nach einem anderen Verfahren fraktionierte Clupeinpräparat stellt danach offenbar noch ein Gemisch zweier Clupeinanteile dar, deren einer Prolin und deren zweiter Serin als endständige Aminosäure trägt; Isoleucin und Threonin scheinen Bausteine der serin-endständigen Komponente zu sein.

Für die Kennzeichnung der Natur der Bausteine und ihrer Reihenfolge im Molekül, die angestrebt wird, sollten daher nur solche Präparate gewählt werden, die zum Beispiel zufolge ihrer Baustein- und ihrer Endbausteinanalyse sich nicht als Mischstoffe erweisen.

E. WALDSCHMIDT-LEITZ, K. KÜHN und FR. ZINNERT
München, den 17. Februar 1951.

Summary

It has been found that clupein, purified by a fractionation of its aqueous solution in the cold, contains only arginine, serine, alanine, valine and proline as constituents, and that a proline residue is placed at the amino end of the peptide chain of its molecule.

¹ Vgl. A. KOSSEL, *Protamine und Histone* (Fr. Deuticke, Leipzig und Wien, 1929). – E. WALDSCHMIDT-LEITZ und E. GÜNTHER, *Makromolekulare Chemie* 2, 120 (1947/48).

² Vgl. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, F. ZIEGLER, A. SCHÄFFNER und L. WEIL, *Z. physiol. Chem.* 197, 219, und zwar S. 224 ff. (1931).

³ E. WALDSCHMIDT-LEITZ und E. GÜNTHER, *l. c.*

⁴ Gemäß der Definition von H. STAUDINGER, *Makromolekulare Chemie und Biologie* (Basel, 1947, S. 126).

Similar Effects of Methylene Blue and of Vitamin E on Liver Storage of Vitamin A in Chicks

As will be reported elsewhere¹, certain manifestations of vitamin-E deficiency in chicks and rats can be prevented by dietary supplements of some substances which easily undergo reduction-oxidation in the body. This applies to the exudative diathesis, encephalomalacia in chicks, and peroxidation and yellow-brown discoloration of adipose tissue in chicks and rats, as well as to depigmentation of the incisors in rats. All these conditions, which are caused by feeding certain highly unsaturated fatty acids, such as those in cod liver oil together with vitamin-E deficient diets, can be prevented by dietary supplements of vitamin E, for instance in the form of *d,l*- α -tocopherol acetate, and greatly depressed by dietary additions of methylene blue, thionine, thiodiphenylamine and several similar compounds. Along with the effect on the symptoms, in chicks, a considerable improvement in growth rate is observed.

In order to study further the cause of the improved growth rate we determined (by the Carr-Price reaction as well as by measurement of the absorption at 325 $m\mu$) the deposition of vitamin A in the liver of chicks receiving an exudate producing diet with 10% cod liver oil, with and without supplements of *d,l*- α -tocopherol acetate (10 mg%) and methylene blue (126 mg%). The determinations were carried out when the chicks had been on the experimental diet for 4 weeks from the 10th day after hatching. They showed that the feeding of methylene blue resulted in a very considerable increase in vitamin A storage in the liver, indicating that also in this respect methylene blue exerts an effect known to be exhibited by vitamin E.

The average values for vitamin A per gram fresh liver, standard deviation of the mean, number of animals and average weight were as follows:

Diet	Vitamin A i. u. per g liver	No. of chicks	Weight g
Basal E-deficient, no. 536, DAM et al. ²	68 ± 13	6	161
Basal + 10 mg% <i>d,l</i> - α -tocopherol acetate	386 ± 47	9	226
Basal + 126 mg% methylene blue	903 ± 106	10	252

A full account of the experiment will be published elsewhere.

Acknowledgement.—We thank F. Hoffmann-la Roche & Co., Basle, for the gift of *d,l*- α -tocopherol acetate (Ephynal) used in these studies.

HENRIK DAM, INGE PRANGE, and EBBE SØNDERGAARD

Department of Biology, Polytechnic Institute, Copenhagen, November 24, 1950.

Zusammenfassung

Küken, die mit einer Dorschlebertran enthaltenden, vitamin-E-freien Nahrung gefüttert werden, lagern viel mehr Vitamin A in der Leber ab, wenn die Nahrung auch Methylenblau enthält. Diese Wirkung des Methylenblaus auf die Vitamin-A-Speicherung ähnelt dem entsprechenden Effekt von Vitamin E und beruht wahrscheinlich auf einer antioxydierenden Wirkung des Leukomethylenblaus.

¹ H. DAM, I. KRUSE, I. PRANGE, and E. SØNDERGAARD, *Acta Physiol. Scand.* (in press). – H. DAM and H. GRANADOS, *Acta Physiol. Scand.* (in press).

² H. DAM, I. KRUSE, I. PRANGE, and E. SØNDERGAARD, *Acta Physiol. Scand.* (in press).