

Gewinnung von 3,5-Dijodtyrosin aus Jodeiweiß.

III. Mitteilung.

Gewinnung desselben aus Jodcasein.

Von

Adolf Oswald.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Eidgenössischen Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. August 1911.)

Das Auffinden von 3,5-Dijodtyrosin unter den Spaltprodukten zweier Jodeiweißpräparate des Handels, des Jodalbazids und des Jodglidins,¹⁾ förderte eine Reihe von Fragestellungen zutage. Einmal stand zu entscheiden, wie sich die Ausbeute an der Jodaminosäure zum Tyrosingehalt des Eiweißes verhält. Speziell mußte ermittelt werden, ob alles Tyrosin im Eiweißmolekül Jod bindet. Was diese Frage anbelangt, so hatten meine negativen Resultate beim jodierten Hühnereiweiß (Jodeigonnatrium)²⁾ schon die Tatsache zutage gefördert, daß auch tyrosinhaltiges Jodeiweiß kein Jodtyrosin unter seinen Spaltprodukten zu liefern braucht. Wenn es sich nicht um eine sekundäre Jodabspaltung handelt, ist somit die Möglichkeit vorhanden, daß auch bei anderen Eiweißarten nicht alles Tyrosin sich an der Jodbindung beteiligt.

In zweiter Linie ergab sich die Frage, um wieviel höher das Jodbindungsvermögen des Eiweißes ist, als seinem Tyrosingehalt entspricht. Schon ein Blick auf die Jodzahlen des Eiweißes zeigt in der Tat, daß das Tyrosin nicht seine einzige jodbindende Gruppe sein kann, da der Jodgehalt größer ist, als sich aus dem Tyrosingehalt berechnen läßt. Ich hatte denn

¹⁾ Ad. Oswald, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 310 (1911), und Bd. 71, S. 200 (1911).

²⁾ Ad. Oswald, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 374 (1911).

auch schon im Jahre 1903¹⁾ den Nachweis erbracht, daß außer dem Tyrosin noch andere Atomgruppen jodbindende Eigenschaften haben. In neuerer Zeit ist nachgewiesen worden, daß ein schon bekannter Spaltkörper des Eiweißes zu diesen zu rechnen ist. Es scheint dies zwar nicht, wie eine Zeitlang angenommen, für das Tryptophan zu gelten, da β -Indolderivate Jod nicht zu binden vermögen.²⁾ Dagegen hat Pauly³⁾ festgestellt, daß Histidin sich unter den gleichen Bedingungen wie das Gesamteiweißmolekül jodieren läßt, wenigstens dann, wenn seine Aminogruppe verankert ist, wie das ja der Fall sein dürfte im Eiweißmolekül. Solange Jodhistidin nicht aus Jodeiweiß gewonnen ist, wird allerdings der zwingende Beweis für die Beteiligung des Histidins an der Jodbindung noch ausstehen.

Den vorliegenden Untersuchungen lag die Absicht zugrunde, die Verhältnisse, soweit sie das Tyrosin betreffen, zu klären und die eingangs angeführten Fragen zu beantworten. Die bisherigen Beobachtungen vermochten darüber keinen Aufschluß zu geben, weil sie an Gemengen verschiedener Eiweißsorten angestellt worden sind, über deren Tyrosingehalt nichts Sicheres auszusagen ist. Eine notwendige Bedingung war es daher, an einem chemisch reinen Individuum zu operieren. Hierzu wählte ich das Casein, das auf seinen Gehalt an Aminosäuren, speziell Tyrosin, so gut es die bisherigen Methoden gestatten, schon untersucht worden ist. Ich verwendete das von Merck beziehbare, nach Hammarstens Vorschrift hergestellte Casein.

Herstellung des Jodcaseins.

Die Jodierung geschah in der Weise, wie ich seinerzeit Jodtyrosin dargestellt habe, bei ungefähr 0°. ⁴⁾ 100 g lufttrockenes Casein wurden in 3 Liter Wasser unter Zusatz der notwendigen Menge Alkali gelöst, darauf im Kältegemisch auf 0° abgekühlt, und von einer Jodjodkaliumlösung von bekanntem Titer langsam und unter Umrühren so lange zugesetzt, bis Jod frei

¹⁾ Ad. Oswald, Hofmeisters Beiträge, Bd. 3, S. 413 u. 520 (1903).

²⁾ Ad. Oswald, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 128 (1911).

³⁾ H. Pauly, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 43, S. 2243 (1910).

⁴⁾ Ad. Oswald, Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 320 (1909).

blieb. Die Lösung nahm dabei ein hellbraunes Kolorit an, blieb aber vollkommen klar. Nach Zusatz von 13 g Jod blieb es frei. Bei einer zweiten Präparation, die ich mit der gleichen Menge Casein vornahm, und die unter den gleichen Bedingungen geschah, wurde die gleiche Jodmenge verbraucht. Die Feststellung dieser Tatsache ist nicht uninteressant, denn sie gewährt einen Einblick in den Jodierungsprozeß. Da die spätere Analyse des Präparates einen Jodgehalt von rund 12—13 % ergab, und von 100 g Eiweiß ausgegangen worden war, hätte ein einfacher Substitutionsvorgang, wie die Jodierung des Tyrosins einen darstellt, die doppelte Menge Jod, also 24—26 g erfordert. Tatsächlich wurden aber weit weniger verbraucht. Infolgedessen darf man annehmen, daß ein nicht geringer Teil des Jods einfach addiert wird, d. h. an ungesättigte Valenzen herantritt. Freilich ist der Jodierungsprozeß kein einfacher Vorgang, da nebenher auch Oxydationen statthaben und Bruchstücke vom Eiweißmolekül losgesprengt werden. Auch unter Berücksichtigung dieses Umstandes scheint aber obige Annahme ihre Berechtigung zu haben. Es sollen übrigens diese Verhältnisse einer näheren Prüfung unterzogen werden.

Nachdem überschüssiges Jod vorhanden war, wurde, nachdem die Lösung einige Stunden gestanden hatte, mit Essigsäure angesäuert, wobei ein üppiger ockergelber, flockiger Niederschlag ausfiel. Er wurde abfiltriert, alsdann in verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung in Pergamentschläuchen der Dialyse anfangs gegen Leitungswasser, später gegen destilliertes unterworfen, bis das Dialysat jodfrei blieb. Der Inhalt der Schläuche wurde danach mit Essigsäure versetzt und der weiße Niederschlag abgepreßt. Die Bestimmung des Jodgehaltes ergab für das eine Präparat 14,39 % Jod, für ein zweites 12,01 %. Eine Schwankung des Jodgehaltes in dieser Breite hatte ich schon bei einer früheren Gelegenheit beim Casein trotz Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen beobachtet. Ich hatte daselbst einen Jodgehalt von 13,45 bzw. 11,43 % gefunden.¹⁾

¹⁾ Ad. Oswald, Hofmeisters Beiträge, Bd. 3. S. 514 (1903).

Analytische Belege.

Präparat I. 0,3591 g Substanz verbrauchten nach ihrer Veraschung 55,4 ccm einer Thiosulfatlösung, von welcher 1 ccm 0,0009333 g Jod entspricht, was 0,0517 g J ausmacht = 14,39% J.

Präparat II. 0,4748 g Substanz verbrauchten 61,1 ccm Thiosulfatlösung = 0,5702 g J = 12,01% J.

Spaltung.

178,5 g noch feuchter Substanz (entsprechend, wie an einer Probe festgestellt, 85,5 g trockener Substanz) wurden zusammen mit 272 g Ätzbaryt in 800 ccm Wasser eingerührt und das Gemenge im Rundkolben zunächst auf dem Wasserbade erwärmt, dann unter Rückflußkühlung auf freier Flamme 23 Stunden in schwachem Sieden erhalten. Nach 6stündiger Siedezeit und am Schluß des Siedens wurden kleine Proben entnommen, um darin, ähnlich wie in den früheren Versuchen, den Ausfall der Biuretreaktion und das Verhältnis des abgespaltenen zu dem noch gebundenen Jod festzustellen.

In einem zweiten Versuch wurden 201,5 g feuchte (= 88,28 g trockene) Substanz verwendet und das Sieden 26 Stunden andauern gelassen.

Die erste Probe gab deutliche Biuretreaktion (intensive Violettfärbung), die zweite noch schwache, in der dritten fiel sie negativ aus.

Das Verhältnis des als Jodwasserstoff abgespaltenen zu dem in organischer Bindung verbliebenem Jod gestaltete sich in den einzelnen Proben nach folgenden, in tabellarischer Übersicht angeordneten Ziffern.

Siedezeit Stunden	Präparat I. — Jod in %		Präparat II. — Jod in %	
	organisch gebunden	abgespalten	organisch gebunden	abgespalten
6	59,36	40,64	66,35	33,65
15	61,56	38,44	—	—
23	62,64	37,36	—	—
26	—	—	68,43	31,57

Wie ersichtlich, ändert sich, ähnlich wie dies auch bei den früher untersuchten Jodeiweißkörpern beobachtet wurde,

die Verteilung des Jods nach 6stündiger Siedezeit nicht mehr; das Verhältnis blieb konstant auch nach 26stündigem Sieden. Darum wurde das Erhitzen nicht länger fortgeführt. Das Verhältnis des festgebundenen zum abgespaltenen Jod gestaltet sich sonach im 1. Präparat rund wie 62 zu 38, im 2. wie 67 zu 33.

Analytische Belege.

Die Bestimmungen geschahen in derselben Weise wie früher.¹⁾

Präparat I. 1. Probe. 5 ccm der Lösung wurden auf 25 ccm verdünnt. 10 ccm dieser Verdünnung verbrauchten nach Veraschung 23,1 ccm Thiosulfatlösung (1 ccm = 0,0009333 g J) = 0,021559 g J, was für 10 ccm der unverdünnten Lösung 0,1076 g J ausmacht. 15 ccm der auf das Fünffache verdünnten Lösung wurden mit Salpetersäure und Silbernitratlösung auf 20 ccm verdünnt, vom ausgeschiedenen Jodsilber abfiltriert, im Filtrat das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt und in 15 ccm des Filtrates das Jod bestimmt. Es wurden dazu 15,4 ccm Thiosulfatlösung verbraucht = 0,01437 g J, was bei Umrechnung mit den Verdünnungsfaktoren auf die ursprüngliche nicht verdünnte Lösung für 10 ccm 0,0638 g J ausmacht. Verhältnis des festgebundenen zum Gesamtjod = 59,36 : 100,0.

2. Probe. 5 ccm wurden auf das Fünffache verdünnt. 10 ccm der Verdünnung verbrauchten 27 ccm Thiosulfatlösung = 0,1259 g J für 10 ccm der nicht verdünnten Lösung. 15 ccm der auf das Fünffache verdünnten Lösung wurden mit Salpetersäure und Silbernitratlösung auf 20 ccm verdünnt und in 14,6 ccm des entjodeten und entsilberten Filtrates das Jod bestimmt. Es wurden 18,2 ccm Thiosulfatlösung verbraucht = für 10 ccm der ursprünglichen nicht verdünnten Lösung 0,0775 g J. Verhältnis des festgebundenen zum abgespaltenen Jod = 61,56 : 38,44.

3. Probe. 5 ccm wurden auf 25 ccm verdünnt. 10 ccm verbrauchten 20,6 ccm Thiosulfatlösung = 0,0960 g J für 10 ccm der ursprünglichen nicht verdünnten Lösung. 15 ccm der auf das Fünffache verdünnten Lösung wurden mit Salpetersäure und Silbernitrat auf 20 ccm verdünnt, und nach Entfernung des Jodsilbers und Silbers in 15 ccm das Jod bestimmt. Es wurden 14,5 ccm Thiosulfatlösung verbraucht = für 10 ccm der ursprünglichen nicht verdünnten Lösung 0,06014 g J. Verhältnis des festgebundenen zum abgespaltenen Jod = 62,64 : 37,36.

Präparat II. 1. Probe. 5 ccm wurden auf das Fünffache verdünnt. 10 ccm der Verdünnung verbrauchten 17,3 ccm Thiosulfatlösung = 0,0807 g J für 10 ccm der nicht verdünnten Lösung. 15 ccm der auf das Fünffache verdünnten Lösung wurden mit Salpetersäure und Silbernitratlösung auf 20 ccm verdünnt und in 15 ccm des entjodeten und entsilberten Filtrates das Jod bestimmt. Es wurden 12,9 ccm Thiosulfatlösung verbraucht

¹⁾ Siehe meine früheren Abhandlungen.

= für 10 ccm der ursprünglichen nicht verdünnten Lösung 0,0535 g J.
Verhältnis des festgebundenen zum abgespaltenen Jod = 66,35 : 33,65.

2. Probe. 5 ccm wurden auf das Fünffache verdünnt. 10 ccm der Verdünnung verbrauchten 17,4 ccm Thiosulfatlösung = 0,0811 g J für 10 ccm der nicht verdünnten Lösung. 15 ccm der auf das Fünffache verdünnten Lösung wurden mit Salpetersäure und Silbernitratlösung auf 20 ccm aufgefüllt und in 15 ccm des entjodeten und entsilberten Filtrates das Jod bestimmt. Es wurden 13,4 ccm Thiosulfatlösung verbraucht = für 10 ccm der ursprünglichen nicht verdünnten Lösung 0,0555 g J.
Verhältnis des festgebundenen zum abgesprengten Jod = 68,43 : 31,57.

Am Schluß der Siedezeit wurde die noch heiße Lösung filtriert und dadurch von einem sandigen Bodenkörper getrennt, der aus Baryumcarbonat und -sulfat bestand, welche beide, wie nachträglich eruiert, vom verwendeten Baryt herrührten. Der Filtrerrückstand wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis es farblos abfloß, und die Waschflüssigkeit mit dem Filtrat vereinigt.

Die Lösung wurde auf freier Flamme eingeengt und, nach dem Erkalten, von dem ausgeschiedenen Baryt getrennt, danach wieder mit Wasser verdünnt und mit ausgekochter halbverdünnter Salpetersäure bis zur deutlich kongosauren Reaktion versetzt. Es entstand dabei kein Neutralisationspräzipitat. Als dann wurde mit Silbernitrat gefällt und von dem ausgeschiedenen Jodsilber abfiltriert. Das hellbraungelbe Filtrat wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, und abwechselungsweise Silbernitrat und Ammoniak so lange zugesetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Die weiße flockige Fällung wurde abgenutscht, mit Wasser verrieben und mit Schwefelwasserstoff entsilbert. Aus dem vom Schwefelsilber getrennten Filtrat scheiden sich schon nach wenigen Stunden Krystalle von dem Aussehen des 3,5-Dijodtyrosins aus. Anderen Tags wurden sie abfiltriert und gewogen. Die Ausbeute betrug 0,8 g. Die Krystalle wurden aus heißem verdünnten Alkohol umkrystallisiert und als 3,5-Dijodtyrosin identifiziert.

Schmelzpunkt 204°, starkes Aufbrausen beim Schmelzen. Jodgehalt 58,53%. 0,1748 g Substanz ergaben 0,1875 g AgJ = 0,1023 g J. Berechnet für $C_9H_9O_3NJ_2$ 58,66%.

Bei der zweiten Darstellung betrug die Ausbeute 0,9 g.
Die von den Krystallen getrennte Mutterlauge wurde auf

dem Wasserbade eingeengt, es schieden sich jedoch auch nach längerem Stehen keine Krystalle mehr aus. Die Lösung wurde daher wieder mit Wasser verdünnt, die letzten Reste mitgerissenen Baryts mit Schwefelsäure entfernt, das Filtrat mit Schwefelsäure bis zu 5% versetzt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der flockige Niederschlag wurde in der üblichen Weise zersetzt und die Prozedur einigemal wiederholt. Aus den vereinigten Filtraten schied sich jedoch nach dem Einengen auf dem Wasserbade und im Vakuumexsikkator selbst nach längerem Stehen nichts aus. Gleichwohl enthielt der Sirup viel organisch gebundenes Jod. Nach vergeblichen Versuchen, zu einer Krystallisation zu gelangen, wurde die zu einem gelben Firnis eingetrocknete Masse wieder in Wasser gelöst, und die Lösung mit Mercurisulfat versetzt. Der dadurch entstandene Niederschlag enthielt nur wenig Jod, dagegen war das weißgelbe Filtrat sehr reich an organisch gebundenem Jod. Es gelang nicht, daraus ein krystallinisches Produkt zu erhalten.

Das Gesamtergebnis dieser Untersuchung geht dahin, daß aus Jodcasein 3,5-Dijodtyrosin sich darstellen läßt, daß jedoch die Ausbeute nur gering ist, nämlich aus rund 80 g bloß 0,8 g, d. h. ca. 1% beträgt. Da Dijodtyrosin 58,6% Jod enthält, so waren somit, immer vorausgesetzt, daß keine sekundäre Jodabspaltung statthat, nur 0,58 g Jod in der Form von Dijodtyrosin zugegen, und da Jodcasein 12—14% Jod in organischer Bindung enthält, folgt daraus, daß bloß 4—5% des Jods an Tyrosin gebunden sind. Da andererseits aus Casein 4,5% Tyrosin gewonnen wurden, entspräche die Ausbeute an Dijodtyrosin bloß dem 10. Teil des Tyrosingehaltes. Durch diese Ziffern bestätigt sich von neuem die schon mehrmals ausgesprochene Behauptung, daß noch andere Gruppen sich an der Jodbindung beteiligen müssen.