

# Mitteilungen aus dem Gebiete der Eiweißchemie.

## I.

### Über Jodbindungsfähigkeit und Konstitution der Proteine.

Von

F. Blum und E. Strauß.

(Aus dem biologischen Institut zu Frankfurt a. M.)  
(Der Redaktion zugegangen am 17. November 1920.)

Die Geschichte der Halogenierung der Proteine hat sich bisher in zwei Phasen abgespielt. Böhm und Berg<sup>1)</sup> stellten im Jahre 1876 unter Erweiterung älterer Angaben fest, daß Jod mit Hühnereiweiß in Reaktion tritt, wobei es zu einer einfachen Aneinanderlagerung komme — einer Verbindung äußerst lockerer Natur, der unschwer alles Jod entzogen werden könne. Schon ein Jahr vorher hatte Knop<sup>2)</sup> bei Einwirkung von Mineralsäure und Brom auf Eiweiß ein bromhaltiges Eiweißspaltprodukt zu isolieren vermocht und Loew<sup>3)</sup> fand später bei Einwirkung von Brom auf Albumin sogar eine geringe Menge des Halogens in fester organischer Bindung. Jendrassik<sup>4)</sup> hat 1892 als nächster Forscher sich mit Jodprotein beschäftigt, ohne sich jedoch von den sich abspielenden Umsetzungen ein klares Bild zu machen. Mit der Feststellung von Blum<sup>5)</sup> im Jahre 1896, daß den Proteinen allgemein die Eigenschaft zukommt, sich mit Halogen

<sup>1)</sup> Archiv f. exp. Pathologie u. Pharm. Bd. 5, S. 329 (1876).

<sup>2)</sup> Centr. 1875, S. 395, 411, 420.

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Chem. [2] Bd. 31, S. 138.

<sup>4)</sup> Ungar. Arch. f. Medizin 1892, I S. 85.

<sup>5)</sup> Münchn. mediz. Wochenschr. 1896 Nr. 45 und Kongreß f. inn. Medizin, Juni 1897. — Weitere Literaturangaben finden sich bei Blum und Vaubel (s. später) und bei Kurajeff (s. später).

umzusetzen und dabei das Halogen intramolekular aufzunehmen, so zwar, daß neben viel überschüssigem Halogenwasserstoff eine bestimmte Menge Halogen substituierend, d. h. in eine feste organische Verbindung eintritt, wurde der Forschung ein neuer Anstoß gegeben. In rascher Folge wurden jetzt Methoden zur Darstellung von Halogenproteinen und Beobachtungen an ihnen veröffentlicht, die zu beträchtlichen Aufklärungen über die vorliegenden Verhältnisse geführt haben. Im besonderen waren es die Jodproteine, deren Studium eifrig betrieben wurde, wobei die Wahl des Ausgangskörpers und die Art der Jodierung jeweils in den Vordergrund getreten sind.

Zwei Methoden der Jodierung haben sich für die Folge zur Darstellung von Jodproteinen eingebürgert: diejenige in saurer Lösung ( $\text{JK} + \text{JO}_3\text{K} + \text{H}_2\text{SO}_4$ ) nach Hofmeister<sup>1)</sup> und die Einwirkung von Jodjodkali in Natriumbikarbonat — alkalischer Lösung nach Blum und Vaubel<sup>2)</sup>. Während die erstere als einziges Ziel anstrebt, stets freies Jod dem zu halogenierenden Protein zuzuführen, baut die Methode von Blum und Vaubel auf der Erkenntnis auf, daß der bei der Einwirkung von Halogen auf Proteine entstehende Halogenwasserstoff die restlose Halogensubstitution des Proteins verhindert und deshalb beseitigt werden muß. In dem Zusatz von überschüssigem Bikarbonat, das von dem zuzuführenden freien Jod nur Spuren wegnimmt, war zu dem geplanten Zweck ein besonders geeignetes Mittel gefunden, da es den Jodwasserstoff bindet und bei seiner geringen Alkaleszenz gegenüber den Proteinstoffen ohne spaltende Eigenschaften bleibt. Die vergleichenden Forschungen von Blum und Vaubel haben ergeben, daß in der Tat die Methode der sauren Jodierung nach der Vorschrift von Hofmeister nicht zu einer maximalen Substitution der Proteine führt; denn obwohl die von Hofmeister, Kurajeff<sup>3)</sup> u. a. damit gefundenen Jodzahlen höher

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 24, S. 158 (1897).

<sup>2)</sup> Journ. f. prakt. Chemie [2] Bd. 56, S. 393 (1897) und Bd. 57, S. 365 (1898).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 462 (1899) und Bd. 31, S. 527 (1901).

lagen als die Jodzahl nach der Blum-Vaubelschen Methode am gleichen Ausgangsmaterial, ließ sich dartun, daß die Sättigung mit Jod eine unvollkommene und die Höhe des Jodwerts nur durch eingetretene Spaltungen am Molekül bedingt war. Später hat Kurajeff selbst die Bikarbonatmethode zur Jodierung des Hämoglobins angewandt und Oswald<sup>1)</sup> benützte sie zur Jodierung der Albumosen des Witte-Peptongemisches. Blum und Vaubel haben bei Erprobung ihrer Methode die Wahrnehmung gemacht, daß einem ganz kleinen Anteil von Jodwasserstoff gegenüber das Protein sich als die im Vergleich mit dem Bikarbonat stärkere Base erweist, ohne daß jedoch die geringen, hierdurch an das Proteinmolekül sich anheftenden Säuremengen die maximale Jodierung zu behindern vermögen. Dieser Umstand macht es lediglich notwendig, das Jodierungsprodukt aus einer Lösung in stärkerem Alkali umzufällen, um nicht durch den locker gebundenen Jodwasserstoff einen zu hohen Wert für das in das Molekül eingetretene Jod zu erhalten. Später hat Kurajeff das Bikarbonat durch Magnesiumkarbonat ersetzt; er hat dabei zu hohe Zahlen erhalten, die mit denen der Säurejodierung übereinstimmen, aber, wie wir im experimentellen Teil dieser Arbeit zeigen werden, gleichfalls durch eine Spaltung des Proteinmoleküls bedingt sind. Wenn Oswald bei der Jodierung von Albumosen in der Anwendung von Magnesiumkarbonat oder Bikarbonat keinen Unterschied in den Jodwerten seiner Substanzen gefunden hat, so erklärt sich dies vielleicht dadurch, daß sein Ausgangsmaterial bereits ein Spaltprodukt von größerer Widerstandskraft gegenüber der Jodierung in Magnesiumkarbonatlösung darstellt.

Nachdem die Methode der Jodierung und die Reinigung der jodierten Eiweißkörper von Blum und Vaubel ausgearbeitet war, hat Blum<sup>2)</sup>, dem Vorgang Hofmeisters folgend, eine Anzahl möglichst einheitlicher, d. h. nach Maßgabe der derzeitigen Kenntnis rein dargestellter Proteine jodiert und

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge Bd. 3, S. 391 (1903) und *ibid.* S. 514.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 28, S. 288 (1899).

durch Vergleich der gewonnenen Werte untereinander eine charakterisierende Jodzahl der Eiweißkörper aufzustellen versucht. Sollen derartige Zahlen als klassifizierende Kennzeichen von Wert sein, so muß verlangt werden, daß bei der Jodierung eine einheitliche und — soweit überhaupt möglich — das Molekül nicht schädigende Darstellungsmethode verwendet wird.

Welche Umwandlungen bei der Halogenierung der Proteine sich am Molekül vollziehen, haben Hofmeister und seine Schüler, Blum und Vaubel, Schmidt<sup>1)</sup> u. a. nach verschiedenen Richtungen studiert. Die Ergebnisse seien in Kürze zusammengestellt. Hofmeister und Hopkins<sup>2)</sup> zeigten unabhängig voneinander als erste, daß nach der Jodierung die vorher positive Millonsche Reaktion negativ ausfiel. Hofmeister bezog dies auf eine Veränderung im Tyrosin und vermutete, daß dessen Hydroxylgruppe abgespalten werde, erkannte aber bald, daß, wie Blum und Vaubel zeigten, eine solche Abspaltung nicht stattfindet. Letztere Autoren haben dargetan, daß die Halogensubstitution sich in der Tat am Tyrosin abspielt, und zwar in der Weise, daß zwei Halogenatome die Orthostellungen zur Hydroxylgruppe besetzen. Dies fand seine volle Bestätigung dadurch, daß die von Drechsel<sup>3)</sup> aus dem Jodeiweißkörper des Achsenskeletts von *Gorgonia Cavolinii* dargestellte Jodgorgosäure als l-Dijodtyrosin erkannt und dann auch synthetisch dargestellt wurde (Henze<sup>4)</sup>, Wheeler und Jamieson<sup>5)</sup>, Oswald<sup>6)</sup>). Oswald<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 34, S. 55, 194 (1901), Bd. 35; S. 386 (1902); Bd. 36, S. 343 (1902).

<sup>2)</sup> Berichte Bd. 30, II, S. 1824 (1897) und Pinkus, ibid. Bd. 31, II, S. 1311 (1898).

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biologie Bd. 33, S. 84 (1896), II. u. III.; vgl. a. Moerner, diese Zeitschr. Bd. 51, S. 33 (1907) und Bd. 55, S. 77 (1908) und Wheeler und Mendel, Journ. of biol. Chemistry Bd. 7, S. 1 (1909).

<sup>4)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 51, S. 64 (1907).

<sup>5)</sup> Americ. Chem. Journ. Bd. 33, S. 365 (1905).

<sup>6)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 59, S. 320 (1909). Vgl. a. Abderhalden und Guggenheim, Berichte Bd. 41, S. 1237 (1908).

<sup>7)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 70, S. 310 (1910); Bd. 74, S. 290 (1911); Bd. 75, S. 353 (1911); Bd. 71, S. 200 (1911).

hat weiterhin in einer Reihe von Untersuchungen Dijodtyrosin aus künstlich jodierten Proteinen isoliert. Seine Ausbeuten waren allerdings gering, ein Umstand, der zum Teil auf die Benützung ungenügend intramolekular jodierten Materials, zum Teil auf die eingreifende Methode der Darstellung zurückzuführen ist.

Ob ein weiterer aromatischer Kern im Proteinmolekül — etwa das Phenylalanin — bei der Halogenierung substituiert werde, ist trotz eifrigen Bemühens nicht einwandfrei feststellbar gewesen. So vielfach die Vermutung einer solchen Substitution auftauchte, so mußte sie doch immer wieder als unbewiesen zurückgestellt werden. Wie in dem zweiten Teile dieser Arbeit mitgeteilt werden wird, haben wir Glutin, das tyrosinfrei ist, aber nach der sicherlich doch zu niedrige Werte liefernden Hydrolyse mindestens 0,4% Phenylalanin enthält, der Jodierung unterworfen und dabei einen so geringen Gehalt an Kernjod (0,21%) gefunden, daß wir hieraus wohl eine unvermeidbare Unreinheit des Ausgangsmaterials, nicht aber eine intramolekulare Substitution des Glutins an seinem Phenylalaninkomplex zu erschließen vermögen.

Das Schicksal des Tryptophans bei der Halogenierung ließ sich erst deutlich verfolgen, nachdem in der Indolreaktion mit dem Ehrlichschen *p*-Dimethylamidobenzaldehyd durch Neubauer und Rohde<sup>1)</sup> ein Prüfstein auf Tryptophan geschaffen war. Der schon bisher beobachtete negative Ausfall der Reaktionen nach Liebermann und Adamkiewiz am jodierten Protein fand nun durch Rohde seine Erklärung dahin, daß das sowohl diese Reaktionen als auch die Reaktion mit dem Ehrlichschen Aldehyd verursachende Tryptophan an der für die Kupplung in Betracht kommenden Stelle bei der Jodierung verändert wird. Den Arbeiten von Emil Fischer<sup>2)</sup>, M. Freund<sup>3)</sup> und Feist<sup>4)</sup> verdanken wir die Kenntnis, daß die eine der beiden CH-Gruppen des Pyrrol-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 44, S. 161 (1905).

<sup>2)</sup> Berichte Bd. 19, S. 2988.

<sup>3)</sup> Berichte Bd. 36, S. 308.

<sup>4)</sup> Berichte Bd. 35, S. 1647.

ringes im Indol mit Aldehyden in Reaktion tritt. Im Tryptophan ist nur die  $\alpha$ -CH-Gruppe frei, da die  $\beta$ -Stelle durch den Alaninarm besetzt ist. An dieser Stelle vermag anderseits nach den Untersuchungen von Pauly und Gundermann<sup>1)</sup> Jod nicht einzutreten. Da nun aber durch die Jodierung der Proteine die Ehrlichsche Aldehydreaktion negativ wird, so muß man schließen, daß jene  $\alpha$ -CH-Gruppe als die einzige für den Aldehyd zugängliche, durch Oxydation (etwa zu einer COH-Gruppe) verändert ist, wofern man nicht eine völlige Zerstörung des Tryptophans in Form einer Ringsprengung annehmen will. Eine Oxydation in dem gedachten Sinn wird durch die Untersuchungen von Pauly und Gundermann am Skatol in hohem Grade wahrscheinlich gemacht. Eine Jodaufnahme durch das Tryptophan — etwa im Benzolring — lehnt Pauly ab.

Zu den bei der Halogenierung veränderten Aminosäuren, dem Tyrosin und dem Tryptophan, tritt als dritte das Cystin hinzu. Es ist allen Untersuchern der späteren Periode aufgefallen, daß der leicht abspaltbare Anteil des im Protein vorhandenen Schwefels — der Veranlasser der Schwefelbleireaktion — den Jodproteinen fehlt. Nach den Untersuchungen von Baumann<sup>2)</sup>, Schulz<sup>3)</sup> und Suter<sup>4)</sup> ist dieser leicht abspaltbare Schwefel nur derjenige des Cystins, dessen Gesamtschwefel äußerst langsam durch kochendes Alkali abgespalten wird. Es muß daher angenommen werden, daß sich bei der Jodierung eingreifende Veränderungen am Cystin vollziehen, bei denen dessen Schwefel oxydiert wird. Einen Anhaltspunkt für diese Annahme liefert der Befund von E. Friedmann<sup>5)</sup>, der den Übergang von Cystin in Cysteinsäure unter Einwirkung von Brom beobachtet hat. Bei der Bestimmung des Schwefelgehalts der Jodproteine wurden nun mehrfach Werte gefunden, die sich demjenigen des genuinen

<sup>1)</sup> Berichte Bd. 41, S. 4002 (1908).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 8, S. 299 (1884); Bd. 20, S. 583 (1895).

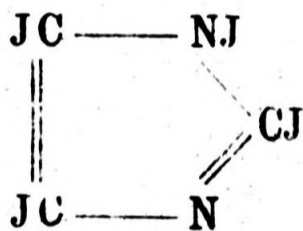
<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 25, S. 16 (1898).

<sup>4)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 20, S. 564 (1895).

<sup>5)</sup> Hofmeisters Beiträge Bd. 3, S. 25 (1903).

Proteins nähern; in einigen Fällen dagegen ergaben sich Werte, die für den Verlust etwa der Hälfte des Schwefels zu sprechen scheinen. Somit geht der Cystinschwefel nicht nur durch Oxydation in eine widerstandsfähige, nicht mehr bleischwärende Form über, sondern es wird auch unter Umständen eines der beiden Schwefelatome aus dem Cystinkomplex herausgenommen. Daß in manchen Proteinen der Schwefel lockerer gebunden ist als in anderen, spricht keinesfalls gegen dessen Sitz im Cystin. Man muß sich erinnern, daß das Cystin in seinen Peptidbindungen sehr mannigfaltig verkettet und dadurch in seinem inneren Zusammenhalt verschiedenartigst beeinflußt sein kann.

Von großer Wichtigkeit für die Kenntnis der jodophoren Gruppen im Proteinmolekül sind die Untersuchungen, die H. Pauly<sup>1)</sup> dem Histidin gewidmet hat. Pauly hat gezeigt, daß der Imidazolring imstande ist, drei Jodatome am Kohlenstoff und eines am Imidstickstoff zu binden. Es gelang ihm, das Imidazol vollkommen mit Jod zu sättigen und so ein Tetrajodimidazol darzustellen:



Hier besteht nun ein wesentlicher Unterschied in der Festigkeit der Jodbindung zwischen dem Stickstoffjod einer- und den drei Kohlenstoffjodatomten andererseits, indem das Tetrajodimidazol durch Behandlung mit schwefliger Säure das Stickstoffjod einbüßt und in ein Trijodimidazol (nur C-jodiert) übergeht. Das Histidin selbst, auf dessen reaktive Ähnlichkeit mit dem Tyrosin Pauly hinweist, hat dieser Forscher nicht in isolierter Form zu jodieren vermocht; es gelang ihm aber die Gewinnung des Benzoyl-, p-Nitrobenzoyldijodhistins und des Tetrajodhistidinanhydrids, welches letzteres auffallenderweise unter stärkerer Einwirkung von schwefliger Säure (in der Wärme!) das eine Paar C-gebundenen Jods wieder verliert

<sup>1)</sup> Berichte Bd. 43, S. 2243 (1910).

und in ein Dijodhistidinanhydrid übergeht. Pauly hat die Unterschiede zwischen N- und C-jodierten Imidazolen genau studiert und seine Erhebungen auch auf das Sturin ausgedehnt, welches kein Tyrosin, aber 12,9 % Histidin enthält. In einer späteren Arbeit hat er dann für die Jodproteine die Entfernung des N-gebundenen Jods als Postulat aufgestellt, wobei es unentschieden bleibt, ob das im Protein an N gebundene Jod am Histidin oder an einem anderen basischen Anteil haftet. Pauly<sup>1)</sup> spricht die Vermutung aus, daß die künstlichen Jodproteine den größten Teil ihres Jods in dieser „locker gebundenen“ Form enthalten. Dem ist nicht so, wie die im experimentellen Teil dieser Arbeit mitzuteilenden Jodwerte der Proteine darzutun werden. Dem Studium des dem Proteinmolekül durch SO<sub>2</sub> entziehbaren Jodanteils verdanken wir aber eine erhebliche Bereicherung unserer Kenntnisse von den Jodproteinen. Sicherlich ist jenes Jod (N-Jod) gegenüber dem Kernjod des Proteinmoleküls lockerer gebunden; aber vom Jodhydrat oder nur angelagertem Jod unterscheidet es sich scharf: weder Lauge noch Säure trennen bei den üblichen Reinigungsverfahren diesen Anteil des Gesamtjods vom Jodeiweißmolekül ab. Dementsprechend kommt dem N-Jod neben dem an Kohlenstoff gebundenen „Kernjod“ eine ganz besondere konstitutive Bedeutung zu.

Haben wir hiermit die Aminosäuren, soweit bisher von ihnen Beteiligungen und Umsetzungen beim Jodierungsprozeß bekannt geworden sind, erschöpft, so müssen wir, ehe wir auf unsere neuen Untersuchungen eingehen, noch diejenigen Beobachtungen erwähnen, die sich noch nicht mit Schärfe auf Umsetzungen an wohlumschriebenen Aminosäuren zurückführen ließen. Hierhin gehört das Verhalten der Biuretreaktion bei der Halogenierung der Proteine, von der Blum und Vaubel nachgewiesen haben, daß sie im genuinen Protein mindestens durch zwei Gruppen des Moleküls bedingt wird, deren eine ihre Reaktionsfähigkeit durch die Halogenierung einbüßt. Die Beweisführung stützte sich auf das Erhaltenbleiben der posi-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 76, S. 291 (1911).



tiven Reaktion im ungespaltenen Halogeneiweiß und anderseits auf das Versagen der Biuretprobe an dem laugegespaltenen, durch Schwefelsäure fällbaren Jodproteinanteil, dem ohne vorherige Jodierung eine positive Biuretreaktion zukommt.

Die Entwicklung von Jodoform bei der Jodierung von Protein nach ihrer Methode haben Blum und Vaubel als eine regelmäßige Erscheinung bezeichnet, ohne dieselbe damals schon ihrem Ursprung nach lokalisieren zu können. Es ist uns gelungen, eine Quelle der Jodoformbildung im Cystin zu entdecken.

Viel umfassender scheint sich das allen Untersuchern aufgefallene Auftreten von überschüssigem Halogenwasserstoff abzuspielen. Zuerst überhaupt als einzige Antwort auf das Verschwinden des Halogens von seiten des Eiweißmoleküls angesehen, erwies sich späterhin, daß jedenfalls weit mehr Halogenwasserstoff entsteht, als den durch Halogen ersetzten Wasserstoffatomen entspricht. Es ist versucht worden, aus den gebildeten Mengen von Halogenwasserstoff Schlüsse auf die Zusammensetzung und Größe des Eiweißmoleküls zu ziehen. Hierzu fehlen vorderhand die sicheren Unterlagen der Methode und des Konstitutionseinblicks im allgemeinen. Woran man sich aber gerade im Hinblick auf die in der Halogenwasserstoffbildung sich aussprechenden starken Oxydationen erinnern darf, das sind die von vielen Autoren beobachteten Entgiftungen toxischer Proteinsubstanzen und der bei der Jodierung eintretende Fortfall spezifischer biologischer Reaktionen und anaphylaktischer Wirksamkeit (Freund<sup>1</sup>), Schittenhelm und Ströbel<sup>2</sup>)).

Im experimentellen Teil dieser Arbeit berichten wir über einige quantitative Bestimmungen des bei der Jodierung von Serumalbumin in Bikarbonatlösung entstehenden Jodwasserstoffs. Die unter den gewählten Bedingungen entstandenen Mengen übertrafen die aus der Substitution sich erklärenden Zahlen um das 4,3—4,4fache. Ein nicht unbeträchtlicher An-

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 503 (1909).

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. Bd. 11, S. 102 (1912).

teil hiervon errechnet sich aus jetzt bekannten Faktoren: der Oxydation des Tryptophans und besonders des Cystins; denn jedem eintretenden Sauerstoffatom entsprechen je 2 Moleküle Jodwasserstoff. Weiterhin ist mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß dem Verschwinden der Biuretreaktion Oxydationsprozesse zugrunde liegen, durch die nochmals ein Anteil des überschüssig gebildeten Jodwasserstoffs seine Erklärung findet. Wieviel davon allerdings jeder Phase der Einwirkung von Jod auf das Proteinmolekül entspricht, muß vorläufig noch unentschieden bleiben. Bedingt es doch schon einen Unterschied von 6 Jodwasserstoffmolekülen allein auf das Cystin, wenn nur ein Schwefelatom zu  $\text{SO}_3\text{H}$  oxydiert ist gegenüber der völligen Oxydation zu Cysteinsäure ohne Schwefelabspaltung. Wir haben in der Erwartung, daß in dem Prolin ein weiterer Jodwasserstoffbildner gegeben sein könne, auch diesen Eiweißspaltling in den Kreis unserer Untersuchung gezogen. Einen sicheren Anhalt für die Richtigkeit unserer Vermutung haben wir aber bisher nicht gefunden. Immerhin ist schon durch die jetzt nachgewiesenen Oxydationen am Proteinmolekül ein beträchtlicher Teil der beobachteten Jodwasserstoffbildung gedeckt. Für das Serumalbumin sind, wie sich ergeben wird, 4 Atome Jod als intramolekular gebunden anzunehmen. Den bei dieser Substitution entstandenen 4 Jodwasserstoffmolekülen stehen 2 Moleküle aus der Tryptophanoxydation und 6 Moleküle aus der Oxydation des Cystinschwefels gegenüber, denn letzteres ist bei 0,81 % Schwefelgehalt des Gesamtmoleküls offenbar der Hälfte seines Schwefels beraubt, während die verbliebene Hälfte oxydiert ist (Fehlen der Schwefelbleireaktion). Zusammengerechnet entfallen somit 4 Moleküle auf die Substitution und 8 Moleküle auf die bekannten Oxydationen.

Die Jodoformbildung, deren bereits oben Erwähnung getan wurde, dürfen wir, wenn nicht vollständig, so doch zu einem erheblichen Teil auf Umsetzungen am Cystin zurückführen. In wiederholten Versuchen konnten wir das überraschende Resultat bestätigen, daß reines Cystin, mit Jod und Bikarbonat im Überschuß versetzt und bei  $37^\circ$  gehalten, unter Absorption

des Jods alsbald Jodoform entstehen läßt, während gleichzeitig der Schwefel oxydiert wird. Einer unserer Versuche sei hier in seinem Verlauf wiedergegeben:

Cystin, das nach den Angaben von Patten<sup>2)</sup> durch Fällung mit Quecksilbersulfat aus dem Hydrolysat von Pferdehaaren rein dargestellt war, wurde (0,2 g) unter Zusatz von viel Natriumbikarbonat in Wasser gelöst, mit 10 ccm einer 2 n-Jodjodkalilösung versetzt und 24 Stunden lang bei 37° digeriert. Nach Ablauf dieser Zeit war die Schwefelbleireaktion negativ und der Geruch nach Jodoform äußerst stark. Die mit Essigsäure angesäuerte Flüssigkeit gab auf Kochen mit Ätzbaryt (nach vorheriger Entfernung der sofort sich in geringer Menge bildenden unlöslichen Baryumsalze) keinen Niederschlag, ebensowenig war dies mit dem gleichen Reaktionsgemisch beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure der Fall. Mehrere weitere Versuche führten zu dem gleichen Resultat in Bezug auf Jodoformbildung und Verschwinden der Schwefelbleireaktion bei längerer Versuchsdauer. Die intensive Oxydation und Bildung von Jodwasserstoff zeigte sich auch dadurch an, daß stets mit starkem Bikarbonatüberschuß gearbeitet werden mußte, weil das Reaktionsgemisch sonst alsbald stark congosauer wurde.

Neben der Oxydation zu Cysteinsäure spielt sich hier offenbar eine Abspaltung am Cystin als Nebenreaktion ab, die zu der Jodoformbildung führt.

Blum und Vaubel haben die These aufgestellt: „Im Eiweißmolekül sind mindestens 2 die Biuretreaktion verursachende Gruppen vorhanden; die eine wird durch die Halogenierung unwirksam gemacht, während die andere bei derselben intakt bleibt. Spaltet man das Eiweißmolekül mit Alkalien, so findet sich jene zweite, die Biuretreaktion gebende Gruppe an dem schwefelhaltigen Abspaltungsprodukt.“ Es ist in der Folgezeit diese für die Konstitution des Proteinmoleküls gewiß nicht unwichtige Beobachtung fast völlig in Vergessenheit geraten. In der Absicht, späterhin dem hier auftauchenden Problem näherzutreten, haben wir die Richtigkeit der Aus-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 39, S. 350 (1903).

gangsbeobachtung einer Nachprüfung unterzogen und können die Angaben der früheren Arbeit bestätigen.

100 g Casein wurden mit 1 l einer 5%igen Natronlauge 4 Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt, nach dem Abkühlen filtriert und sodann die klare Lösung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Der entstehende Niederschlag gab positive Biuretreaktion. Er wurde in bekannter Weise jodiert und gab nunmehr nach der Jodierung keine Biuretreaktion mehr. Weiterhin wurde das Jodserumalbumin A der gleichen Spaltung unterworfen: das mit Schwefelsäure fällbare Produkt zeigte ebenfalls keine Biuretreaktion mehr. Schließlich wurde auch am Jodserumalbumin C nach der abiureten Gruppe gesucht und auch hier ihr Vorhandensein bestätigt. Es wäre denkbar gewesen, daß das bei der Jodierung in das Proteinmolekül eintretende und durch schweflige Säure wieder entziehbare Jod bei der Verwandlung des einen biuretgebenden Proteinanteils in eine abiurete Gruppe eine Rolle spiele; dies ist aber nicht der Fall: die Biuretreaktion tritt nicht wieder auf, wenn man auf das jodierte Spaltprodukt des Caseins schweflige Säure einwirken läßt, und außerdem stellt sich die abiurete Gruppe, wie oben gezeigt, auch bei der C-Substanz als vorhanden heraus, in welche ein N-Jod gar nicht eingetreten ist. Diese Verwandlung eines biuretgebenden Anteils des Proteinmoleküls ist also nicht nur irreparabel, sondern auch unvermeidlich. Durch bestimmte Abänderungen des Jodierungsverfahrens können, wie nachher dargetan werden soll, einzelne Strukturveränderungen am Eiweißmolekül hintangehalten werden. Die Veränderung jener zweiten Biuretgruppe gehört nicht hierher: sie entstammt einer wesentlichen Eigenschaft des Halogenierungsprozesses.

Bis jetzt haben wir die Begleiterscheinungen der Jodierung von Proteinen erörtert; von eingreifender Bedeutung aber für die Konstitutionserforschung ist vornehmlich das in das Proteinmolekül eintretende Jodatome. Dies allein ist Richtkörper an den Bausteinen des Riesenbaues und erlaubt, gewisse Struktureigentümlichkeiten und Mengenverhältnisse in den Kreis der Betrachtung zu ziehen.

Wieviel Jodatome treten in das Proteinmolekül ein? Wo haften dieselben? Wie ist die Festigkeit ihrer Bindung? Diese und noch manche andere Frage taucht auf.

Wo im Gegensatz zu dem Ausgangsmaterial nach der Halogenierung die Millonsche Reaktion fehlt, da sind sicher Halogenatome in den Tyrosinkomplex des Proteinmoleküls eingetreten: darüber besteht allseitige Übereinstimmung. Im Verfolg der Paulyschen<sup>1)</sup> Untersuchungen über Jodderivate des Imidazols und des Histidins mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß auch in diese Gruppe Jod eintreten werde. Soweit es sich hierbei um ähnlich feste Bindungen handelt, wie diejenigen am Tyrosin, würde es schwer fallen, Unterscheidungsmerkmale zwischen beiden aufzustellen. Jenes am N verankerte und mit kalter  $\text{SO}_2$ -Lösung abspaltbare Jodatom aber, das Pauly beim Protein gewissermaßen als überzählig angesehen hat, konnte, wofern es nur bei jedem einzelnen Protein in konstanter Weise und Menge auftrat, für eine Halogenbilanz des Gesamtmoleküls den Ausgangspunkt abgeben. Nach den unten wiederzugebenden Befunden unserer Untersuchungen erfüllt das N-Jod alle hierfür nötigen Vorbedingungen: es tritt in alle Proteine, die überhaupt die aufnahmefähige Gruppe besitzen, bei der Jodierung in stets gleicher Menge ein und verharret darin bei den üblichen Reinigungsmethoden und Umfällungen mit Lauge, Säure, Alkohol, Ather usw. Durch die reduzierende Einwirkung der schwefligen Säure in der Kälte wird jenes N-Jod dem Molekül entzogen und dabei resultiert wiederum ein Jodprotein mit konstantem Jodgehalt und charakteristischen Eigenschaften. Durch abermalige Hochjodierung gelangt man von neuem zu dem erstgewonnenen, maximal jodierten Protein. Von ganz besonderer Bedeutung aber ist die Tatsache, daß das N-Jod zu den nach der  $\text{SO}_2$ -Einwirkung verbleibenden C-Jodatomen in einem stets gleichen unwechselbaren Verhältnis steht. Besser als alle abstrakten Darlegungen wird hier das Beispiel veranschaulichen und zu klaren Vorstellungen führen:

<sup>1)</sup> l. c.

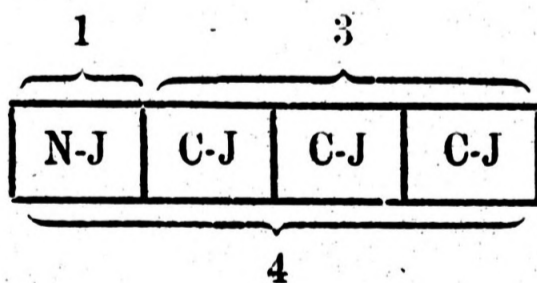
Das Globin nimmt bei der maximalen Jodierung nach Blum-Vaubel 11,4% Jod in das Molekül auf. Gleichzeitig verschwindet die vorher positive Millonsche Reaktion. Behandelt man dies Jodglobin („A“) mit  $\text{SO}_2$ , bis kein Jod mehr abgespalten wird, so resultiert ein Jodglobin („B“) mit 7,6% Jod, ohne daß die Millonsche Reaktion wieder positiv geworden wäre. Durch neuerliche Hochjodierung kann man abermals aus der B-Substanz eine A-Substanz mit dem früheren Jodgehalt gewinnen und kann diese nochmals zu B mit 7,6% reduzieren.

Vergleicht man die Jodzahlen miteinander, so erkennt man, daß dem N-Jod im Verhältnis zu dem Gesamtmolekül ein Prozentgehalt von  $11,4 - 7,6 = 3,8$  entspricht. Dem C-Jod kommen beim Globin 7,6% zu, woraus sich ergibt, daß auf 1 N-Jod ( $2 \times 3,8 = 7,6$ ) 2 C-Jod entfallen. Nachdem auch bei der B-Substanz die Millonsche Reaktion negativ geblieben ist, sind, solange wir nicht ein Vielfaches von 3 Jodatomen als ins Globin eingetreten annehmen, die beiden Jodatome als Tyrosinjod zu bezeichnen. Die Schlußfolgerungen sind einfach: in das Globinmolekül werden bei maximaler Jodierung 3 Jodatome (oder ein Vielfaches von 3) eingefügt;  $\frac{1}{3}$  hiervon befindet sich in loserer Bindung am N,  $\frac{2}{3}$  in fester Bindung an dem aromatischen Ring des Tyrosins. Jedem Jodatome entspricht ein Prozentgehalt von 3,8, woraus sich als Molekulargröße des Jodglobins 3340 oder ein Vielfaches hiervon errechnet. Auf die mannigfaltigen sonstigen Einblicke, die die gewonnene Erkenntnis gewährt, wird später zurückzukommen sein.

Ein weiteres Protein, in dem auf 2 Kernjod 1 N-Jod vorhanden ist, fanden wir im Jodoalbumin, dessen Maximalzahl (A) 7,55% beträgt, während nach  $\text{SO}_2$ -Reduktion noch 5,12% (B) verbleiben. Dem N-Jod entspricht demnach ein Prozentgehalt von  $7,55 - 5,12 = 2,43$ . Das Abweichen dieses Wertes von der genauen Hälfte von  $5,12 = 2,56$  liegt durchaus innerhalb analytischer Grenzwerte. Da auch A- und B-Jodoalbumin keine positive Millonsche Reaktion mehr besitzen, so gilt auch für diese Substanz, daß ihr Kernjod dem

Tyrosin angehört. Hierzu ist allerdings eine Einschränkung zu machen: sollten nicht 3, sondern ein Vielfaches von 3 Jod-Atomen in das Molekül eingetreten sein, dann liegt die Möglichkeit vor, daß dem zweiten N-Jod 2 in andere als dem Tyrosinkomplex eingefügte Kernjodatome entsprechen können. Wofern man annimmt, daß das N-Jod stets nur an der Imid-gruppe des Imidazols bzw. Histidins verankert ist, lassen sich aus den bei der hydrolytischen Aufspaltung des betreffenden Proteins erhaltenen Mengen von Histidin und Tyrosin einige, allerdings mit vielen Unsicherheiten behaftete Anhaltspunkte zur Beurteilung obiger Frage gewinnen.

Die Mindestmolekulargröße des Jodoalbumins berechnet sich unter Zugrundelegung eines Prozentgehaltes von 2,51 für jedes Jodatome auf 5060. Die Mindestwerte für das Globin und das Ovalbumin stehen zueinander im Verhältnis ihrer maximalen Jodzahlen. Wollte man in diesem Sinne etwa aus den Maximalzahlen anderer Proteine auf deren Größe Schlüsse ziehen, so würde man durchaus fehlgehen. Denn es hat sich ergeben, daß keineswegs überall auf 1 N-Jod 2 C-Jodatome eintreten. So enthält das Serumalbumin A 8,16% Jod, die daraus gewonnene B-Substanz 6,73%, woraus sich für das N-Jod ein Prozentgehalt von 2,23 errechnet. Bildlich läßt sich das Verhältnis der Jodzahlen in diesem Falle etwa folgendermaßen darstellen:



Im Serumglobulin trifft man auf 4 Kernjodatome 1 N-Jod-atom an, da die A- und B-Zahl mit 8,3 und 6,67 eine Differenz von 1,66 für das N-Jod ergeben und dessen Verhältnis zum Ganzen demnach 1:4 beträgt.

Auch ein Protein ohne N-Jod haben wir gefunden: das Casein. Es besitzt keine B-Zahl, denn nach gründlichster Umfällung in der gewöhnlichen Weise vermag schweflige Säure kein Jod mehr abzuspalten.

In diesen Befunden sprechen sich konstitutive Eigentümlichkeiten der einzelnen Proteine aus, die beim Vergleich untereinander und unter Berücksichtigung bisher bekannt gewordener Bausteine der Proteine noch wesentlich an Schärfe gewinnen.

Beginnen wir mit dem Globin, so müssen wir aus dem gefundenen Verhältnis zwischen N-Jod und C-Jod von 1 : 2, wie schon oben ausgeführt, entnehmen, daß mindestens einmal im Molekül ein Histidin einem Tyrosin entspricht. Käme kein anderer C-Jodträger als das Tyrosin in Betracht, dann könnte man aus der Jodzahl von 7,6 % Kernjod den Tyrosingehalt des Globins bestimmen durch die Formel  $7,6 : x = 254 : 181$ , worin mit 254 die beiden Jodatome und mit 181 das Tyrosin ohne Berücksichtigung seiner Peptidbindung eingesetzt sind. Das Resultat würde für x den Tyrosingehalt des Globins zu 5,4 % ergeben. Die Hydrolyse des Hämoglobins hat Abderhalden<sup>1)</sup> durchgeführt und dabei nur 1,33 % Tyrosin gefunden. Wenn auch jede Hydrolyse mit recht erheblichen Verlusten selbst des leicht auffindbaren Tyrosins einhergehen wird, so schließt doch der hier vorliegende Abstand zwischen gefundenem (1,33) und errechnetem (5,4) Wert aus, daß alles Kernjod auf Tyrosin zu beziehen ist. Es drängt sich die Annahme auf, daß das Globinmolekül umfangreicher ist, und daß zwar einem N-Jod ein Tyrosinkomplex mit 2 Jodatomem entspricht, einem zweiten jedoch eine andere kernjodtragende Gruppe oder deren zwei mit je einem Kernjod gegenüberstehen. Vielleicht muß man sogar die Formel verdreifachen. Unter der Voraussetzung, daß z. B. in der einen „Globinabteilung“ Histidin mit 1 N-Jod sich findet und Tyrosin mit 2 C-Jod, in der zweiten aber das Histidin selber 1 N-Jod und 2 C-Jod trägt, erniedrigt sich der verlangte Tyrosingehalt auf die Hälfte von 5,4 %, d. i. 2,7 %. Kann man mit irgendwelcher Wahrscheinlichkeit vermuten, daß entweder ein zweites Histidin völlig jodiert ist oder eine andere Gruppe mit 2 Kernjod zu einem N-Jod gehört, dann reduziert sich der errechnete Tyrosingehalt auf den dritten Teil = 1,8, womit allerdings ein Nähe-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 37, S. 484 (1903) und *ibid.* Bd. 41, S. 397 (1907).



rungswert an den bei der Hydrolyse erhaltenen Wert erreicht wäre.

Handelt es sich hier zunächst nur um Mutmaßungen, so dürfen wir ihnen doch so viel Berechtigung zuerkennen, daß wir sagen: die Mindestgröße des Jodglobins von 3340 ist wenigstens mit 2, vielleicht sogar mit 3 zu multiplizieren. In letzterem Falle wären in dem Molekül von der Größe 10020 1 Tyrosin und 3 N-Jodträger enthalten, welche letzteren noch weitere 4 Kernjodatome an anderen, noch nicht sicher erkannten Stellen beanspruchen.

Sehr interessante Einblicke in die Konstitution erlaubt der Zusammenhalt des an der Imidgruppe jodierten Histidins mit dem von Abderhalden bei der Hydrolyse erzielten Wert für die Gesamtmenge dieser Aminosäure. Wenn man die durch die Untersuchungen von Pauly nächstliegende Anschauung vertritt, nämlich, daß das N-Jod dem Histidin anhaftet, dann errechnet sich aus dem Jodwert von 3,8 für das entsprechende Histidin  $3,8 : x = 127 : 155$ ;  $x = 4,64$  als prozentualer Histidingehalt im Globin. Bei der hydrolytischen Aufspaltung des Globins sind aber 10,96% Histidin gefunden worden. Da die Säurezersetzung jedenfalls keinen zu hohen Wert (eher einen zu niedrigen) liefert, so kann man annehmen, daß entsprechend dem errechneten Wert von 4,64 und dem gefundenen von 10,96 je einem an der NH-Gruppe des Imidazolrings jodierbaren Histidin zwei andere an dieser Stelle nicht reaktionsfähige Histidine entsprechen. Ist aus Gründen, die wir oben dargelegt haben, die Mindestgröße des Globins zu vervielfachen, dann enthält das Molekül ein entsprechendes Vielfaches von Histidinen, also 2- oder 3mal 3, von denen ein Drittel dergestalt in das Protein eingefügt ist, daß es eine der Jodierung zugängliche Imidgruppe behalten hat, während die anderen beiden Drittel an jener Stelle für den Zutritt von Jod gesperrt sind. Dabei bleibt die Möglichkeit bestehen, daß von dem Vielfachen des in seiner Imidgruppe angreifbaren Histidins oder von den hier unfreien Histidinen je nach der Vervielfachung 1 oder 2 Histidinmoleküle 2 Kernjodatome tragen. Bei verdoppelter Formel des Jodglobins ließe sich

bezüglich Histidin und Tyrosin demnach folgendes schematische Bild entwerfen:

1 N-jod. Histidin  
2 C-jod. Tyrosin  
Histidin  
Histidin

+

1 N-jod. Histidin  
2 C-jod. Histidin  
Histidin

oder:

1 N-jod. Histidin  
2 C-jod. Tyrosin  
Histidin  
Histidin

+

1 N-jod. und 2 C-jod. Histidin  
Histidin  
Histidin

Beide Gruppierungen berücksichtigen, daß sich im Globin N-Jod zu C-Jod wie 1 : 2 verhalten und daß N-jodiertes Histidin zu dem am N nicht jodierbaren Histidin wie 1 : 3 berechnet werden muß. Nicht berücksichtigt ist, daß aus dem Tyrosin-gehalt eine Verdreifachung der Globinmindestgröße entnommen werden kann, wodurch eine dritte Abteilung ähnlich der zweiten anzureihen wäre.

Abderhalden hat bei der Hydrolyse des Globins 4,24 % Phenylalanin gefunden. Ein solch hoher Gehalt an dieser scheinbar zur Halogenaufnahme unfähigen Aminosäure fordert für die Zukunft zu neuen Nachforschungen heraus, ob nicht doch hier noch unter bisher unbekanntem Umständen ein Kernjodträger gegeben ist.

Bezüglich des Tyrosins liegen beim Ovalbumin die Verhältnisse ähnlich wie beim Globin. Die Hydrolyse (Abderhalden und Pregl<sup>1)</sup>) lieferte hier 1,1 % Tyrosin<sup>2)</sup>. Aus der Jodzahl des mit SO<sub>2</sub> reduzierten Jodoalbumins berechnet sich nach der Gleichung  $5,12 : x = 254 : 181$  für x ein Tyrosingehalt von 3,65 %. (Wir unterlassen hier wie oben die Umrechnung auf jodfreies Protein, um die Frage nicht zu sehr zu komplizieren; der Fehler ist durchaus unwesentlich.) Die große Differenz zwischen den beiden Werten legt es wiederum nahe, die Tyrosinzahl zu teilen und das Molekül entsprechend und mit den oben erörterten Tendenzen zu vergrößern. Bei der Hydrolyse

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 46, S. 24 (1905).

<sup>2)</sup> Phenylalanin 4,4 %.

des Ovalbumins konnte kein Histidin, sondern nur Arginin (2,14) und Lysin (2,15) gewonnen werden<sup>1)</sup>. Aus dem N-Jodgehalt des Jodoalbumins A würde sich errechnen:  $2,5 : x = 127 : 155$ ;  $x = 3,05$  als Mindestgehalt an Histidin unter der Voraussetzung, daß eben nur das Histidin jenes abspaltbare Jod an seiner Imidgruppe bindet. (Die Zahl 2,5 ist das Mittel zwischen dem für N-Jod gefundenen Wert von 2,43 und dem durch Halbierung des C-Jods errechneten Prozentwert für ein Jodatom = 2,56.) Der volle Histidinanteil könnte sogar noch größer sein, da, wie wir beim Globin erkannt haben, die Art der Verankerung des Histidins im Molekül einmal eine Substitution an der Imidgruppe erlaubt, ein anderes Mal dagegen nicht. Es drängt sich hier die Frage auf, ob man der Hydrolyse oder dem N-Jod eine größere Beweiskraft bezüglich des Histidinnachweises zusprechen will. Dem N-Jod kommt insofern Sicherheit des Ergebnisses zu, als über seine An- oder Abwesenheit jeder einzelne Versuch zu dem gleichen und eindeutigen Resultat führt. Unentschieden aber muß einstweilen bleiben, ob nicht doch noch neben dem Imidazolring andere aufnahmefähige Imidgruppen im Proteinmolekül vorhanden sind. Diesen Vorbehalt wollen wir ausdrücklich festlegen. Wir haben aber noch keinen Anlaß, die Annahme eines anderen N-Jodträgers auf Grund des gegensätzlichen Verhaltens des Ovalbumins als sicher zu bezeichnen. Es wird zu prüfen sein, ob die einzelnen Proteine sich selbst nur annähernd gleich gegenüber möglichst gleichmäßig geleiteten Aufspaltungen verhalten und ob nicht hier eine Unsicherheit hydrolytischer Ergebnisse vorliegen kann. Bei der Zersetzung des Cystins und des Tryptophans beim Jodierungsprozeß beispielsweise und als Analogie haben wir einen durchaus verschiedenen Ablauf beim Globin und beim Serumalbumin konstatiert: das erstere bewahrt sein Cystin noch intakt, wenn das Tryptophan schon lange oxydiert ist, während beim Serumalbumin der Prozeß gerade umgekehrt abläuft. Man

<sup>1)</sup> Hugouenq und Galimard, Compt. rend. de l'Acad. des Sciences Bd. 143, S. 242 (1908).

wird nicht umhin können, Abweichungen im feineren Molekularbau für derartige Differenzen verantwortlich zu machen.

Aus den heute schon ziemlich übersichtlichen konstitutiven Beziehungen zwischen N-Jod und C-Jod fallen die Proteine heraus, die auf 1 N-Jod 3 C-Jod aufnehmen. Dies ist beim Serumalbumin der Fall. Auch hier müssen wir 2 Jodatome dem Tyrosin zusprechen, da die Millonsche Reaktion bei der Halogenierung verschwindet. Eine Erörterung darüber, welchem Proteinbaustein dies 3. C-Jodatome zuzusprechen ist, liegt vorläufig noch zu sehr auf spekulativem Gebiet; dagegen läßt sich wiederum der Mindestgehalt des Serumalbumins an Histidin durch die Gleichung  $2,23 : x = 127 : 155$  errechnen: er ergibt sich (wenn 2,23 den prozentualen Anteil des N-Jods im Gesamtmolekül darstellt) zu 2,71%. Wie weit müssen aber die unter der Bezeichnung „Albumin“ geeinten Proteine — Ovalbumin und Serumalbumin — strukturell auseinanderstehen, wenn dem einen auf 3 eintretende Jodatome 1 N-Jod, dem anderen aber erst auf 4 ein solches zukommt.

Den Typus 1 N-Jod : 4 C-Jod repräsentiert das Serumglobulin. Man könnte hier mutmaßen, daß einem Histidin zwei Tyrosine im Molekül entsprechen; aber dann bezifferte sich der Tyrosingehalt auf 4,73% ( $6,64 : x = 254 : 181$ , wobei 6,64 den Kernjodgehalt des Jodserumglobulins angibt) — ein Wert, der den analytisch bisher für das Serumglobulin von Abderhalden und Slav<sup>1)</sup> gefundenen von 2,5 erheblich überschreitet. Histidin ist im Jodserumglobulin zumindest mit 2,03% vertreten ( $1,66 : x = 127 : 155$ , 1,66 ist hier der N-Jodgehalt in Prozenten). Wie wiederholt betont, handelt es sich dabei nur um jenes an der NH-Gruppe durch Jod substituierbare Histidin.

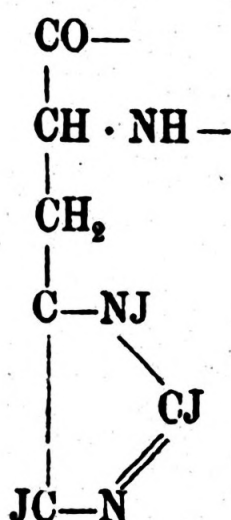
Bei dem Casein erlaubt umgekehrt das Fehlen des N-Jods insofern gewisse Schlußfolgerungen, als sich daraus ableiten läßt, daß die in ihm nachgewiesene Histidinmenge — Hart<sup>2)</sup> fand 2,6% — in Hinsicht auf ihre Imidgruppe für die Halogenierung unempfindlich in das Proteinmolekül eingebaut ist.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 59, S. 247 (1909).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 33, S. 347 (1901).

Die 7% Kernjod des Caseins werden bei diesem Protein in guter Annäherung durch seinen Tyrosingehalt gedeckt; denn jenen 7% entsprechen laut Berechnung ( $7,0 : x = 254 : 181$ ) 5% Tyrosin, während die Hydrolyse des Caseins (E. Abderhalden und A. Schittenhelm<sup>1)</sup>) 4,5% lieferte.

Warum beim Histidin in einem Falle die Imidgruppe allein der Jodierung zugänglich ist, im anderen Falle zusammen mit den CH-Gruppen, findet seine Erklärung durch das Verhalten der drei Ringkohlenwasserstoffe beim freien Imidazol (nach Pauly). Waren dieselben durch  $\text{CH}_3$  substituiert, dann trat bei der Jodierung nur die NH-Gruppe in Reaktion und es entstand jene wenig feste Jodverbindung mit einem N-Jod. Aus den am Kern jodierten Imidazolen konnte Pauly durch Nachjodierung jeweils auch den am N-jodierten entsprechenden Körper gewinnen. Ausgeschlossen war die N-Jodierung nur, wenn die NH-Gruppe ihrerseits alkyliert war. Bei seinen Parallelversuchen am Histidin hat Pauly, weil es ihm nur auf jene Jodhistidine ankam, in denen das Jod fest am Kohlenstoff haftet, stets in der Kälte jodiert und mit  $\text{SO}_2$  nachbehandelt. Er erhielt dann Dijodhistidinderivate, in denen die beiden noch reaktionsfähigen CH-Gruppen mit Jod reagiert hatten. Unsere Anschauungen über das Verhalten des Histidins im Proteinmolekül bei der Jodierung müssen wir unter diesen Umständen aus dem Vergleich mit den Imidazolverbindungen herleiten und können, von dieser Grundlage ausgehend, die Annahme machen, daß eine Volljodierung an einem im Proteinmolekül peptidartig eingeschalteten Histidin 3 Jodatome an Stelle der H-Atome einfügt:



<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 47, S. 458 (1906).

Werden die beiden substituierbaren CH-Gruppen unfrei — um einen nichts vorwegnehmenden Ausdruck zu gebrauchen —, so tritt jene Konfiguration mit ausschließlicher N-Jodierung ein, die wir bei einer Anzahl von Jodproteinen vermuten mußten (s. o.). Bei anderen wiederum erachten wir es für recht wahrscheinlich, daß die NH-Gruppe „unfrei“ geworden ist, während die CH-Gruppen substituierbar blieben. Hierhin gehören jene Proteine, deren Histidingehalt die für N-Jod gefundenen Werte überschreitet, ohne daß die Kernjodzahlen durch das vorhandene Tyrosin beglichen wurden. Das Globin weist derartige Bedingungen auf.

Im Casein, von dem kein N-Jod aufgenommen wird und dessen C-Jod durch seinen Tyrosinanteil gedeckt wird, muß das darin nachgewiesene Histidin sowohl in seinen CH-Gruppen als in seiner NH-Gruppe „unfrei“ sein.

Wir haben also in Bezug auf Jodierbarkeit mit folgenden Arten des Vorkommens von Histidin in den verschiedenen Proteinmolekülen zu rechnen:

1. Nur an der NH-Gruppe substituierbar — unfrei an den CH-Gruppen.
2. Nur an den CH-Gruppen substituierbar — unfrei an der NH-Gruppe.
3. Sowohl an den CH- wie an der NH-Gruppe substituierbar.
4. An CH- und NH-Gruppen nicht substituierbar.

Zur Kategorie 1 zählen wir das Globin, von dessen reichem Histidingehalt aber möglicherweise auch Anteile in Kategorie 2 und 3 unterzubringen sind. In Kategorie 4 ist das Casein einzureihen.

Wie schon früher erörtert, liegen augenblicklich keine zwingenden Gründe gegen die Annahme vor, daß das von uns bei der Jodierung von Proteinen gefundene N-Jod der Anwesenheit von Histidin entstammt. Mit Ausschneiden von Tryptophan und Prolin als N-Jodträger sind die bekannten NH-haltigen Ringe des Eiweißmoleküls erschöpft. Da nun

auch die Art des Eintritts des N-Jods in vielen Punkten — hierauf kommen wir noch zurück — den bei den Imidazolen erhobenen Befunden entspricht, so benützen wir bis zur Widerlegung die Histidinhypothese als heuristisches Moment.

Die Entdeckung der verschiedenartigen Bindung des Jods in den Jodproteinen und die damit einhergehende Möglichkeit der Loslösung eines bestimmten Anteils des Halogens hat, wie im Vorstehenden dargetan wurde, zu einer Erweiterung unserer Kenntnisse von der Mindestgröße des Proteinmoleküls und zu einer Vertiefung unseres Einblicks in seinen molekularen Bau geführt. Allen Vorstellungen aber werden hemmende Fesseln angelegt, solange man den Einwand nicht entkräften kann, daß mit der Jodierung weitgehende Zerstörungen des Proteinmoleküls verknüpft sind, wie ja der Wegfall des bleischwärenden Schwefels und das Verschwinden der Tryptophanreaktion bewiesen. Eine zunächst scheinbar geringe Abänderung der Jodierungsmethode ist uns hier zu Hilfe gekommen und hat nach mehreren Richtungen die erstrebte Ergänzung geschaffen: jodiert man nach der Blum-Vaubelschen Methode, unterbricht aber den Prozeß, sobald die Millonsche Reaktion verschwunden ist, — was im allgemeinen schon nach 3—6 Minuten eintritt, dann erhält man ein Produkt, das bereits alles Kernjod in sich trägt, aber fast oder völlig frei von N-Jod geblieben ist, positive Schwefelbleiprobe und positive Probe nach Neubauer-Rohde zeigt, also das Cystin und das Tryptophan unzersetzt bewahrt hat. Analysiert man eine solche mit der Schnellmethode hergestellte Substanz (wobei, um sicher zu sein, daß nicht doch schon kleine Anteile von N-Jod eingetreten sind, mindestens vergleichsweise eine  $\text{SO}_2$ -Behandlung einzuschalten ist), dann erhält man Jodzahlen, die durchaus denjenigen der sogenannten B-Substanzen, d. h. den durch  $\text{SO}_2$  dejodierten maximaljodierten Proteinen gleich sind. Dabei ist der Schwefelgehalt dem des genuinen Proteins entsprechend und die nicht halogensubstituierbaren aber oxydativ veränderlichen Aminosäuren, das Cystin und das Tryptophan, sind erhalten. So führt dieser einfache Weg zu zwei belangvollen Ergebnissen: einerseits erweist sich, daß die aus den maximal

jodierten Proteinen entstandenen B-Substanzen in ihrer Zusammensetzung nur nebensächlich verändert sind gegenüber den fast intakten Produkten der Schnelljodierung, und andererseits gruppieren sich jetzt die Umsetzungen am Protein in solche vermeidbarer und solche unvermeidbarer Natur. Während die Kernjodierung sich nahezu als Kontaktreaktion abspielt und zur vollen Halogensubstitution des Tyrosins und anderer ebenso intensiv bindenden CH-Gruppen (CH-Gruppen des Histidins?) führt, unterbleibt zunächst vollständig der Eintritt von Jod in die NH-Gruppe. Erst nach und nach beginnt und vollendet sich diese Substitution, womit der ganze Vorgang an Ähnlichkeit mit dem Jodierungsprozeß am Imidazol gewinnt. Oxydationen des Proteinmoleküls setzen schon in der ersten Periode der Jodierung ein; denn die auftretenden Jodwasserstoffmengen überschreiten deutlich die der Substitution entsprechenden Werte; aber ihre Quantität ist doch geringer als die Endsumme bei langdauernder Halogeneinwirkung. Das ist ja auch vollauf durch das Erhaltenbleiben der Reaktionen auf unveränderten Cystinschwefel und auf Tryptophan erklärt. Jodoform tritt bei der Schnelljodierung überhaupt nicht auf, so daß aus dem späteren Handinhandgehen der Cystinveränderung mit der Jodoformbildung die Annahme gestützt wird, daß das Cystin einen hauptsächlichen Jodoformbildner im Proteinmolekül darstellt.

Die Vernichtung der einen Biuretgruppe des Proteins, von der mehrfach die Rede gewesen ist, gehört zu den sofortigen Folgeerscheinungen der Jodierung. Wie Blum und Vaubel dargetan haben, hängt an diesem abiuret gewordenen Proteinanteil auch der Tyrosinkomplex. Eine symmetrische Struktur des Proteinmoleküls, woran man zuweilen gedacht hat, ist durch diese Befunde ausgeschlossen.

Teilen wir die Vorgänge bei der Jodierung, wie sie sich gemäß den Beobachtungen bei der Schnelljodierung darbieten, in sofortige unvermeidbare Hauptreaktionen I und in erst allmählich einsetzende Begleiterscheinungen (Nebenreaktionen) II, so ergibt sich folgende Gegenüberstellung:



## I

- a) Volle Kernjodierung.  
(Verschwinden der Millonreaktion.)
- b) Vernichtung einer Biuretgruppe.
- c) HJ-Bildung aus Oxydationen.

## II

- a) N-Jodierung.
- b) Oxydation von Cystin und Tryptophan.  
(Abspaltung von Schwefel.)
- c) Jodoformbildung.
- d) Weitere HJ-Bildung aus Oxydationen.

Aus dieser Aufstellung erkennt man als ein wesentliches Moment des ganzen Problems den Eintritt des Jods in die zyklischen Ringe des Proteinmoleküls. Vereinigt man hiermit Synthesen, die sich vornehmlich an den Ketten und Seitenketten des Moleküls abspielen werden, wie die Methylierung (Blum<sup>1</sup>, Schwarz<sup>2</sup>), die Benzoylierung (Blum und Umbach<sup>3</sup>), die Methylierung (Edlbacher<sup>4</sup> u. a.) und andere mehr, so eröffnen sich aus dem Vergleich der Resultate wie Kombinationen beider Methoden mancherlei Möglichkeiten, die Ringe und Ketten mit Markierungen zu versehen und dadurch sich einen tieferen Einblick in das molekulare Gefüge der Proteine zu verschaffen. Die Gewinnung selbst nur von Umrissen oder die Aufdeckung von Beziehungen bisher unbekannter Art würde einen Schritt voran auf diesem Wege bedeuten.

Eine solche Spur hat der eine von uns (Strauß) verfolgt, indem er das Verhalten der nach den verschiedenen oben skizzierten Jodierungsmethoden hergestellten Jodproteine bei der peptischen Verdauung studierte. Die bisher erzielten Resultate sind belangvoll genug, um sie hier mitzuteilen. Setzt man maximal jodierte Proteine der Einwirkung von Pepsin-salzsäure bei 37° aus, so bleiben sie unverändert, solange die Salzsäure nicht begonnen hat, das Jod aus seiner molekularen Bindung loszusprengen. Die Dauer dieser „Sperrung“ beträgt oft viele Stunden und tritt besonders bei Vergleichsversuchen mit Substanzen der B-Reihe (N-dejodierte) und solchen der

<sup>1</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 22, S. 127 (1896).

<sup>2</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 460 (1900).

<sup>3</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 88, S. 285 (1913).

<sup>4</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 52 (1919) und Bd. 108, S. 287 (1919) (siehe dort weitere Literaturangaben).

C-Reihe (schnelljodierte) deutlich in die Erscheinung. Die letzteren beiden Jodproteinarten werden dagegen von Pepsinsalzsäure ungefähr gerade so rasch in Lösung übergeführt, wie die genuinen Ausgangsmaterialien. Setzt man aber die B- und C-Jodproteine der Erwärmung auf etwa  $70^{\circ}$  während mehrerer Stunden aus, so hat sich bei den B-Substanzen das Verhalten gegenüber Pepsinsalzsäure wesentlich geändert: sie haben ihre Angreifbarkeit verloren und bleiben ungelöst. Die C-Substanzen lassen manchmal eine gewisse geringfügige Hemmung erkennen, verhalten sich aber im großen ganzen wie ein in gleicher Weise vorbehandeltes genuines Protein. Die gelegentliche Verlangsamung des Lösungsprozesses entspringt höchstwahrscheinlich einer nicht immer gänzlich vermeidbaren Umwandlung der betreffenden C-Substanz im Sinne der B-Substanz.

Wodurch ist dieses ganze Verhalten bedingt und was ist am Molekül vor sich gegangen? Da der Unterschied zwischen der gesperrten A-Substanz (maximaljodiert) und dem nicht gesperrten B-Körper (mit  $\text{SO}_2$  dejodiert) nur auf der An- resp. Abwesenheit des N-Jods beruht, so muß man seiner Gegenwart die Sperrung gegenüber Pepsinsalzsäure zuschreiben. Die Kernjodierung selbst besitzt keinen ähnlichen Einfluß. Die Begründung des gegensätzlichen Verhaltens der B- und C-Substanzen nach ihrer Erwärmung auf  $70^{\circ}$  muß zunächst in völlig anderer Richtung gesucht werden; denn hier kann ja das N-Jod keine Rolle spielen und auch der Umstand seiner vor-maligen Anwesenheit bei den B-Substanzen genügt nicht zur Erklärung, nachdem aus B- wie C-Substanzen in gleicher Weise durch Hochjodierung A-Jodproteine wieder erhältlich sind. (Hiermit ist ausgeschlossen, daß etwa die Einwirkung der schwefligen Säure an dem besonderen Verhalten Schuld sein könnte.) Diese Überlegung drängt dazu, in den anderen Umsetzungen, die die B- und C-Körper durchmachen, die Grundursache zu suchen. Man erinnere sich daran, daß die mittels der Schnelljodierung hergestellten C-Jodproteine ihren Cystin- und Tryptophankomplex intakt bewahrt haben, während die nach maximaler Jodierung durch  $\text{SO}_2$ -Reduktion

dargestellten B-Substanzen an diesen beiden Gliedern ihres Gesamtbaues erhebliche Veränderungen durch oxydative Einwirkung erlitten haben. Hier können Angriffspunkte für die Hitzesperrung gegeben sein. Diese letztere muß man sich wohl als durch eine innere Anhydridbildung bedingt vorstellen. Gegenüber der Salzsäure ist dieselbe sehr beständig; Lösen in Alkali jedoch und Fällen mit Salzsäure aus dieser Lösung hebt die peptische Sperrung auf. Hiernach hat entweder der „Cystinarm“ oder der „Tryptophanarm“ der B-Jodproteine Eigenschaften angenommen, die jene Anhydridbildung und damit die Sperrung gegenüber Pepsinsalzsäure ermöglichen. Da der Cystinkomplex bei der Oxydation seines Schwefels offenbar stark saure Eigenschaften gewonnen hat, wird er wohl kaum als Aufnahmestelle des Pepsinangriffs in Frage kommen; basische Komponenten sind hier die wahrscheinlicheren Rezeptoren. Man wird es aber nicht von der Hand weisen können, daß ebenso wie das oxydativ veränderte Tryptophan auch das im Sinne der Cysteinsäure umgeformte Cystin bei der Erhitzung mit einem basischen Anteil des Proteinkomplexes eine Bindung eingeht und dadurch die Eingangspforte für das Ferment sperrt. Hiermit nähern sich möglicherweise wiederum die scheinbar weit auseinander liegenden Ursprünge der Hemmung durch das N-Jod bei den A-Substanzen und die Sperrung durch innere Anhydridbildung bei den B-Substanzen, indem beide Male ein basischer Komplex des Proteins die entscheidende Rolle spielt und der Weg zu ihm einmal durch Jod, ein anderes Mal durch die Anhydridbildung verlegt wird.

Wie sich andere Substitutionen hier wegweisend anreihen lassen, soll in einer späteren Arbeit erörtert werden.

## Experimenteller Teil.

### I. Die Methoden.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Jodproteinen dienten uns möglichst vollkommen isolierte und sorgfältig gereinigte Proteine in klaren, wäßrigen Lösungen. In keinem Falle kamen vorher koagulierte Stoffe zur Anwendung. Bis

jetzt haben wir nur Proteine des Tierreichs jodiert. Wir versprechen uns aber von der Heranziehung pflanzlicher Proteine noch mancherlei Ausblicke für die Eiweißchemie und werden diesem Forschungsgebiet alsbald nähertreten. Den Proteingehalt unserer Stammlösungen haben wir stets bestimmt und ihn im Durchschnitt auf 1,5 bis 2% des betreffenden Proteins gehalten.

### Die Maximaljodierung.

Die zu jodierende Proteinlösung wird mit Natriumbikarbonat schwach alkalisch gemacht und so erhalten; ein Überschuß bis zur Curcumabräunung wird vermieden. Sodann wird eine etwa doppelt normale Jodjodkalilösung im Überschuß zugefügt und das Gemisch entweder  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde im Wasserbade bei 40° (höher als 45° haben wir die Temperatur nicht steigen lassen) oder längere Zeit bei 37° im Brutschrank digeriert. Man wählt die Jodjodkalimenge so groß, daß nach kürzerer Zeit das Verschwinden des Jods wahrnehmbar ist; dann fügt man immer kleinere Mengen hinzu, bis dauernd Jod ungebunden bleibt. Bei einer Erwärmung auf 37° ist dieser Zeitpunkt im allgemeinen nach 24 Stunden eingetreten. Nun wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und der Jodüberschuß durch einige ccm Natriumthiosulfatlösung entfernt. Die schwach gelblich gefärbte Lösung wird durch ein Papierwollefilter gesaugt und mit (10%iger) Essigsäure zunächst so lange vorsichtig versetzt (Aufspritzen von Aceton verhindert das Überschäumen), bis die jodierte Substanz auszufallen beginnt; dann setzen wir bis zur abermaligen klaren Lösung einige ccm 10%iger Natronlauge zu, um die gebildeten Jodhydrate sicher zu zerstören, und fällen nun vollständig mit Essigsäure. Meist flockt das Jodprotein sofort sehr gut aus; ein Zusatz von Natriumsulfat in konzentrierter Lösung beschleunigt das Absitzen der Substanz. Nun wird mehrfach mit Wasser dekantiert und dann in 80%iges Aceton, dem einige Tropfen Essigsäure zugefügt sind, eingetragen und die nunmehr wasserunlösliche Substanz aufs Filter gebracht. Hier wird das Jodprotein so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis in

einer größeren Menge des Waschwassers keine Spur von Jod mehr nachweisbar ist (Nitrit- oder Jodatprobe). Man muß bei dieser Reinigung sorgfältig vermeiden, die Substanzen unter die Einwirkung von kochendem Wasser zu bringen, um Jod- und Stickstoffverluste zu verhindern. Die so bereitete, maximaljodierte Substanz — wir bezeichnen sie mit „A“ — läßt sich unter Wasser nach Chloroformzusatz unbegrenzt lange aufbewahren.

### Die Gewinnung von ausschließlich am Kohlenstoff jodierten „kernjodierten“ Proteinen.

Aus den maximaljodierten Substanzen gewinnen wir die Proteine mit ausschließlichem „Kernjod“ durch Umfällung ihrer Natriumsalze mittels schwefliger Säure. Die Substanz A wird, ehe sie koaguliert wird, d. h. vor Eintragung in Aceton, mit möglichst wenig verdünnter (bis zu 10%iger) Natronlauge rasch in Lösung gebracht und sofort mit schwefliger Säure in geringem Überschuß versetzt. Man kann auch behufs Vermeidung allzu großer Flüssigkeitsmengen zur Lösung der Substanz eine 2%ige Natronlauge benutzen, die ca. 10% Natriumbisulfit (puriss.) gelöst enthält. Dann fällt man mit verdünnter Schwefelsäure (1:4). Bei dieser Umfällung ist sorgfältig jede Erwärmung des Reaktionsgemischs zu vermeiden. Lösung, Fällung, Abfiltrieren und gründliches Auswaschen mit kaltem Wasser wird so oft wiederholt, bis das Gesamtfiltrat keine Spur Jod mehr enthält. Der hier anzustellenden Nitritprobe muß vorsichtiges Ausfällen etwa im Filtrat gelöster Eiweißanteile durch Phosphorwolframsäure vorhergehen. Ist das Filtrat endgültig jodfrei und demnach alles mit schwefliger Säure abspaltbare Jod der vorher maximaljodierten Substanz entzogen, so wird wieder in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure gefällt und mit Wasser gewaschen und diese letztere Umfällung so oft wiederholt, bis alle anhaftende schweflige Säure entfernt ist. Auch bei diesem Prozeß kann ein Zusatz von Natriumsulfat die Ausflockung beschleunigen; es ist dann natürlich nötig, so lange zu waschen, bis das Filtrat keine Schwefelsäurereaktion mehr gibt. Die gewonnene, aus-

schließlich am Kohlenstoff jodierte „kernjodierte“ Substanz bezeichnen wir mit „B“.

### Die Schnelljodierung.

Die als A und B bezeichneten Jodproteine unterscheiden sich von ihren Ausgangssubstanzen u. a. dadurch, daß sie eine positive Millonsche Reaktion nicht mehr ergeben, bei der Ehrlich-Rohdeschen Probe mit Paradimethylamido-benzaldehyd keine Rot- bzw. Violettfärbung liefern und bei der Probe auf leicht abspaltbaren Schwefel mittels heißer alkalischer Bleisalzlösung keinen Schwefelbleiniederschlag erzeugen. Es sind, wie wir in der Einleitung dargetan haben, neben der Substitution durch das Jod Oxydationsprozesse einhergegangen, die den Tryptophankern verändert und den Cystinkomplex zerstört haben. Um Proteine zu gewinnen, die neben der Substituierung möglichst wenig von Oxydationsprozessen verändert sind, jodieren wir während ganz kurzer Zeiten, d. h. nur so lange, bis die Millon-Reaktion negativ geworden ist. Dies allein ist das Kriterium, daß das Tyrosin komplett jodiert ist. Man jodiert am besten in kleinen Portionen der Proteinlösung (jeweils 100—150 ccm einer 2%igen Lösung) unter Hinzufügung eines Überschusses von Jodjodkali. Die bikarbonatalkalische Lösung wird auf 40—45° erwärmt, die gleichfalls vorgewärmte Jodjodkalilösung zugefügt und das Gemisch unter stetem Umschütteln 6—9 Minuten auf der genannten Temperatur gehalten. Sodann wird sofort der Jodüberschuß durch Thiosulfat entfernt, abgekühlt, verdünnte Natronlauge zugefügt und mit Essigsäure ausgefällt. Hierbei ist der Zusatz von Natriumsulfat von großem Vorteil. An die Ausfällung muß sich, wenn auch oft überhaupt kein Stickstoffjod eingetreten ist, doch der Sicherheit halber eine Umfällung mit schwefliger Säure anschließen: meist wird hier eine einmalige Behandlung ausreichend sein. Die Jodierungsdauer von 6—9 Minuten lieferte in den von uns zu beschreibenden Fällen völlig weiße, feinflockige, im Wasser unlösliche Substanzen — sie mögen mit „C“ bezeichnet werden — mit erhaltener Tryptophan- und Cystinreaktion. Die Jod-

zahl dieser C-Substanzen ist die gleiche wie die der B-Substanzen.

### Die Trocknung der Jodproteine.

Die drei Arten der Jodproteine werden in gleicher Weise zur Analyse getrocknet: Zunächst wird durch Waschen auf dem Filter mittels Aceton oder absolutem Alkohol das Wasser vollkommen verdrängt. Um Verfärbung der Substanzen zu vermeiden, muß ein Eintrocknen bei noch vorhandenem Wassergehalt verhütet werden. Das Jodprotein wird mit (2—3mal destilliertem) Aceton abgespritzt und mit Aceton oder Alkohol abs. einige Minuten heiß digeriert bzw. gekocht. Sodann wird das Aceton auf dem Filter durch Äther verdrängt und die Substanz mit Äther gut gewaschen. Noch anhaftender Äther wird abgesaugt und die Substanz alsbald auf Ton gestrichen. Man gewinnt so in allen Fällen weiße bzw. ganz schwach gelblich gefärbte staubfeine Pulver, die im Exsikkator über Schwefelsäure und durch Erwärmung auf 80—90° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden.

### Die Analyse der Jodproteine.

Die Jodproteine bereiten der Elementaranalyse von C, H und N durch ihre Schwerverbrennbarkeit große Schwierigkeiten; sowohl die alte Methode der Verbrennung, wie auch die Mikroanalyse liefern nicht immer völlig befriedigende Resultate. Es ist stets nötig, die Substanzen zur Verbrennung mit Kupferoxyd und Bleichromat zu vermischen. Für die Stickstoffbestimmung ist meist die Dumasmethode der Methode von Kjeldahl vorzuziehen. Es fällt auf, daß die C-Substanzen bedeutend glatter verbrennen als die A- und B-Substanzen. Die Schwefelbestimmungen wurden nach der Methode von Asboth-Düring bzw. Pringsheim<sup>1)</sup> (Verschmelzen mit Natriumsuperoxyd) vorgenommen. Wägbare Mengen von Asche enthielten unsere Substanzen in keinem Falle. Die Bestimmung des Jods wurde stets nach der von

<sup>1)</sup> Vgl. dazu Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden.

F. Blum und R. Grützner<sup>1)</sup> ausgearbeiteten, sehr genauen Methode ausgeführt. Die zu analysierende Substanz wird in geräumigem Eisentiegel mit calcinierter Soda und etwas Pottasche bedeckt und daneben eine Stange Natriumhydroxyd zum Schmelzen gebracht. Das geschmolzene Ätznatron wird rasch über die Substanz fließen gelassen, dann vorsichtig bis zum völligen Schmelzen und nach Hinzufügung einer Messerspitze Kaliumnitrat bei bedecktem Tiegel bis zum vollkommenen Klarwerden weiter erhitzt. Diese Prozedur soll in ca. 10 Minuten beendet sein. Die erkaltete Schmelze wird gelöst, in einen 2 l fassenden Schottkolben übergeführt und zuerst in alkalischer, dann schwefelsaurer Lösung mit Permanganat oxydiert, wobei alles Jodid in Jodat verwandelt wird. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit Soda wieder alkalisch gemacht und zur völligen Reduktion des Permanganats mit einigen ccm abs. Alkohols gekocht. Nach dem Abfiltrieren des ausgeschiedenen Braunsteins wird die alkoholfreigekochte Lösung mit einem Gemisch von Schwefelsäure und Phosphorsäure angesäuert, etwas Ammonsulfat in Substanz zugesetzt und noch einige Minuten gekocht. Durch Jodkalizusatz wird nun entsprechend der anwesenden Jodsäure die 6fache Menge des in der zu analysierenden Substanz vorhandenen Jods freigemacht und mit n/10-Natriumthiosulfatlösung titriert. Zur Berechnung dient uns der Faktor „Titer der Thiosulfatlösung: 6“ (f), den wir immer durch Einstellung neu bestimmen.

## II. Die Jodproteine.

Die Bildung von Jodwasserstoff bei der Jodierung.

Die Bildung von Jodwasserstoffsäure geht mit der Substitution einher und kann, soweit sie die entsprechenden Werte überschreitet, als Index für die beim Jodierungsprozeß stattfindende Oxydation dienen. Um den Grad der Oxydation bei verschiedener Dauer der Jodierung kennen zu lernen, haben wir Serumalbumin in gemessener Menge mit genau bekannter Menge von Jod behandelt. Gleichzeitig haben wir den Jod-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 85, S. 429 (1913) und Bd. 91, S. 392 (1914).



verbrauch einer reinen äquimolekularen Bikarbonatlösung bestimmt. Proben wurden entnommen nach 3, 6, 9, 12, 30 und 60 Minuten. Die Temperatur war dauernd 40°. Es ergaben sich folgende Zahlen:

a) Reihe 3'—12' in Durchschnitten:

1. Gesamtverbrauch an Jod: 0,286 g,
2. Leerverbrauch für Bikarbonat: 0,040 g,
3. an 0,58 g Serumalbumin festgebunden: 0,044 g.

Es sind demnach für Jodwasserstoffbildung 0,202 g Jod anzusetzen.

b) Reihe 30'—60':

1. Gesamtverbrauch an Jod: 0,330 g,
2. Leerverbrauch für Bikarbonat: 0,041 g,
3. an 0,58 g Serumalbumin festgebunden: 0,052 g;  
für Jodwasserstoffbildung anzusetzen: 0,237 g.

Daraus berechnet sich die Menge von Jodwasserstoffsäure auf 100 g Serumalbumin:

bei kurzdauernder Jodierung . . . . .	35 g
bei langdauernder Jodierung . . . . .	41 g.

Unter den von uns gewählten Bedingungen ist also die 4,3—4,4fache Menge Jod verbraucht worden, die zur Substitution nötig war.

#### 1. Jodoalbumin.

Als Ausgangsmaterial diente kristallisiertes Ovalbumin, das aus frischen Hühnereiern in bekannter Weise gewonnen wurde. Zum Ausdialysieren der Ovalbuminlösungen (wie auch der anderen Proteinlösungen) benützten wir sehr große, ca. 1 bis 1½ l fassende Fischblasen, die, unter Aceton aufbewahrt, viele Male wieder gebraucht werden können<sup>1)</sup>. Die Maximaljodierung lieferte ein schwach gelblich gefärbtes Jodoalbumin A, an dem die Reaktionen nach Millon, Ehrlich-Rohde und die Schwefelbleireaktion negativ ausfielen.

a) CH-Bestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1389 \text{ g} &= 0,2484 \text{ g CO}_2 = 48,8 \% \text{ C} \\ &0,0771 \text{ „ H}_2\text{O} = 6,17 \% \text{ N.} \end{aligned}$$

b) N-Bestimmung (Kjeldahl):

$$\text{Angew. } 0,1948 \text{ g titr. n/5-Säure: } 9,7 \text{ ccm} = 13,95 \% \text{ N.}$$

<sup>1)</sup> Wir haben diese Fischblasen durch die Firma B. B. Cassel in Frankfurt a. M. bezogen.

## c) S-Bestimmung:

Angew. 0,1802 g BaSO<sub>4</sub> = 0,0133 g = 1,01 % S.

## d) Jodbestimmungen:

1.	Angew. 0,1155 g titr. Thiosulfat (f = 1,95)	4,5 ccm	= 8,775 mg J
			= 7,59 % J,
	0,1618 „ „ „ (f = 1,95)	6,3 „	= 12,258 mg J
			= 7,5 % J,
2.	„ 0,1282 „ „ „ (f = 1,95)	5,0 „	= 9,75 mg J
			= 7,6 % J,
	0,143 „ „ „ (f = 1,95)	5,5 „	= 10,725 mg J
			= 7,5 % J.

Durchschnitt: 7,55 % Jod (A-Zahl).

Die Umwandlung dieser A-Substanz in die B-Substanz wurde mit SO<sub>2</sub> in der beschriebenen Weise vorgenommen. Das gewonnene Jodoalbumin B war ein fast weißes Pulver und ergab analytisch folgende Zahlen:

## a) CH-Bestimmung:

Angew. 0,1494 g = 0,2721 g CO<sub>2</sub> = 49,67 % C  
= 0,0863 „ H<sub>2</sub>O = 6,41 % H.

## b) N-Bestimmung:

Angew. 0,1452 g titr. n/5-Säure: 7,25 ccm = 13,99 % N.

## c) S-Bestimmung:

Angew. 0,1682 g BaSO<sub>4</sub> = 0,0119 g = 0,97 % S.

## d) Jodbestimmungen:

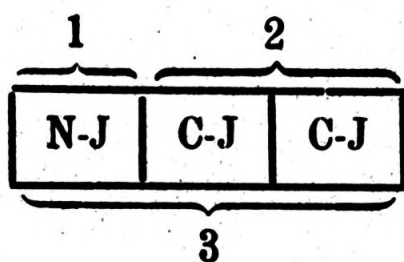
1.	Angew. 0,1545 g titr. Thiosulfat (f = 1,95)	4,0 ccm	
		+ 0,3 ccm n/100-Thios.	= 7,859 mg J = 5,01 % J.
	0,1255 g titr. Thiosulfat (f = 1,95)	3,3 ccm	
		+ 0,6 ccm n/100-Thios.	= 6,532 mg J = 5,2 % J.
2.	Angew. 0,0940 g titr. Thiosulfat (f = 1,91)	2,6 ccm	
			= 4,966 mg J = 5,2 % J.
	0,0717 g titr. Thiosulfat (f = 1,91)	1,9 ccm	
			= 3,625 mg J = 5,06 % J.

Durchschnitt: 5,12 % (B-Zahl).

Vergleicht man die A-Zahl (7,55) und die B-Zahl (5,12) des Jodoalbumins, so ergibt sich, daß sie sich wie 3 : 2 zueinander verhalten, womitargetan wird, daß in das maximaljodierte Jodoalbumin auf je 3 Jodatome 2 Kernjodatome und 1 N-Jodatom eingetreten sind. Den beiden Kernjodatomen entspricht ein Jodgehalt von 5,12 %; dem einen N-Jod ein solcher von (7,55 - 5,12 =) 2,43 %. Errechnet aus der Kern-

iodzahl (5,12 : 2) würde sich 2,56 % für jedes eingetretene Jodatome ergeben — ein mit der Analyse gut übereinstimmendes Resultat.

Zur Veranschaulichung des Strukturbildes des jodierten Ovalbumins diene die Skizze:



worin „1“ dem Gehalt an N-Jod, „2“ demjenigen an Kernjod und „3“ den Gesamtjodaten entsprechen. Es befinden sich im maximaljodierten Ovalbumin demnach 3 Atome Jod oder ein Vielfaches von 3 Atomen, von denen 2 (oder ein Vielfaches davon) am Kohlenstoff, 1 am Stickstoff haften.

Das Ovalbumin ist bereits mehrfach jodiert worden. Blum<sup>1</sup> fand 7,1 % Jod, Hopkins<sup>2</sup>) 7,2 %. Nach der Jodierungsmethode von Hofmeister (in saurer Lösung) fand Kurajeff<sup>3</sup>) 8,54 %. Hofmeister<sup>4</sup>) selbst hatte 8,95 % gefunden. Neuerdings ließ Krzemecki<sup>5</sup>) Jod in methylalkoholischer Lösung auf koagulierte Ovalbumin einwirken und fand nach Einwirkung von siedender konzentrierter Essigsäure auf das gebildete Produkt 24,45 %, nach Behandlung mit Aceton bzw. Natriumthiosulfat bei gewöhnlicher Temperatur 15,63 % bzw. 6,26 % — Zahlen, die aus Gründen der Methodik mit den unsrigen nicht in Vergleich zu setzen sind; denn unseren ausgedehnten Erfahrungen nach führt der Versuch, koagulierte Eiweißkörper einheitlich zu jodieren, nicht zum Ziel.

Aus einem Vergleich des Verhältnisses von C zu N im genuinen Ovalbumin mit den nach der Methode von Hofmeister und jenem von uns angewandten Verfahren hergestellten Jodovalbuminen läßt sich erkennen, daß unsere

<sup>1</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 28, S. 297 (1899).

<sup>2</sup>) Berichte Bd. 30, S. 1860 (1897).

<sup>3</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 462 (1899).

<sup>4</sup>) Diese Zeitschr. Bd. 24, S. 158 (1897).

<sup>5</sup>) Zitiert nach Zentralblatt 1912, S. 2034.

maximaljodierte Substanz das richtige Verhältnis bewahrt hat, während die mit saurer Lösung jodierten Substanzen kohlenstoffreiche Teile abgespalten haben. Ihr hoher Jodgehalt beweist also keine größere Absättigung mit Jod, sondern er ist die Folge einer beträchtlichen Aufspaltung des Eiweißmoleküls. Im genuinen Ovalbumin ist  $C : N = 4,144$  (Hofmeister) bzw. 4,00 (Langstein) oder 4,11 (Osborne). Das Verhältnis ist für unsere A-Substanz  $\left(\frac{C\% : 12}{N\% : 14}\right) = 4,107$ , für die B-Substanz 4,12. Für die Hofmeisterschen Zahlen berechnet es sich zu 3,916, für Kurajeffs Zahlen zu 3,92.

Rechnet man nach der von Blum und Umbach<sup>1)</sup> angegebenen Formel:

$$\frac{\text{Element \%} \times 100}{100 - \text{Jod \%}}$$

auf „jodfrei“ um, so ergibt sich für unsere Zahlen:

$$\begin{array}{ll} \text{A) } C = 52,7 \% & \text{B) } C = 52,3 \% \\ & N = 14,74 \% \\ & N = 15,09 \% \end{array}$$

für Hofmeisters Zahlen ergibt die Umrechnung:

$$\begin{array}{l} C (47,92) = 52,6 \% \\ N (14,27) = 15,6 \% \end{array}$$

für Kurajeffs Zahlen ergibt sich:

$$\begin{array}{l} C (49,04) = 53,6 \% \\ N (14,61) = 15,97 \% \end{array}$$

Vergleicht man diese Zahlen mit den für das genuine Ovalbumin gefundenen Werten, so erweisen sich die Zahlen von Kurajeff besonders in Bezug auf N (Hofmeister: 15,00; Osborne: 15,51; Langstein: 15,29) als zu hoch.

Die Größe des Ovalbuminmoleküls haben Hofmeister und Kurajeff auf ca. 10000 berechnet. R. O. Herzog<sup>2)</sup> hat auf Grund der Einsteinschen Theorie der Braunschen Molekularbewegung die Molekulargröße des Ovalbumins auf 73000 angegeben. (Nach dieser Theorie kann man den Diffusionskoeffizienten großer gelöster Moleküle aus der inneren Reibung, der Loschmidtschen Zahl und dem Molekularradius berechnen.

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Elektrochemie Bd. 16, S. 1003 (1910).

Unter der Annahme, daß das Volumen des gelösten Stoffes sich beim Auflösen nicht ändert, kann man umgekehrt nach Herzog aus dem Diffusionskoeffizienten und der inneren Reibung der Lösung das Molekulargewicht errechnen.)

Legen wir aus unseren Ergebnissen der Berechnung der Molekulargröße des Jodoalbumins zugrunde, daß einem eingetretenen Jodatome ein Prozentgehalt von 2,51 entspricht, so kommen wir zu einer Mindestgröße des Moleküls von 5060 für das jodierte und von 4934 für das jodfrei umgerechnete Ovalbumin.

Das Jodoalbumin C bereiteten wir aus reinem kristallisiertem Ovalbumin von Hühnereiern in der angegebenen Weise: 200 ccm einer etwa 1,5%igen Ovalbuminlösung wurden mit 1 g  $\text{NaHCO}_3$  versetzt und auf  $40^\circ$  gebracht und dann 20 ccm einer 2/n-Jodjodkalilösung (auf  $40^\circ$  vorgewärmt) zugefügt und das Gemisch unter stetem Schütteln 9 Minuten lang auf der gleichen Temperatur gehalten. Hierauf wurde der Jodüberschuß durch Thiosulfatlösung entfernt; die Flüssigkeit abgekühlt; mit wenig verdünnter Natronlauge versetzt und mit verdünnter Essigsäure gefällt. Die Substanz, die in weißen Flocken ausfiel, zeigte keine Reaktion nach Millon mehr, wohl aber eine sehr stark positive Reaktion nach Ehrlich-Rohde und eine starke Schwefelbleireaktion. Nach einer einmaligen Umfällung mit  $\text{SO}_2$  und daran anschließender Umfällung aus alkalischer Lösung mit Essigsäure wurde das Jodoalbumin C in gewohnter Weise gewaschen und getrocknet. Die Analysen der Substanz ergaben folgende Werte:

a) CH-Bestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1502 \text{ g} &= 0,2712 \text{ g CO}_2 = 49,24\% \text{ C} \\ &= 0,0931 \text{ g H}_2\text{O} = 6,8\% \text{ H.} \end{aligned}$$

b) N-Bestimmung (Dumas):

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1551 \text{ g} &= 19,1 \text{ ccm N (b} = 763 \text{ mm, t} = 17^\circ) \\ &= 14,36\% \text{ N.} \end{aligned}$$

c) S-Bestimmung:

$$\text{Angew. } 0,2025 \text{ g BaSO}_4 = 0,0245 \text{ g} = 1,6\% \text{ S.}$$

d) Jodbestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,3092 \text{ g titr. Thiosulfat (f} = 1,95) &= 7,8 \text{ ccm} \\ &= 15,21 \text{ mg Jod} = 4,91\% \text{ Jod.} \end{aligned}$$

Wir haben also hier einen Jodwert erhalten, der demjenigen des Jodoalbumins B entspricht; dabei ist die Oxydationswirkung der Jodierung auf Tryptophan und Cystin hintangehalten. Rechnet man die Zahlen für C und N auf „jodfrei“ um, so ergibt sich:

$$C = 51,88\%; N = 15,1\%.$$

## 2. Jodserumalbumin.

Zur Gewinnung jodierten Serumalbumins verwendeten wir kristallisiertes Pferdeserumalbumin und nichtkristallisiertes Hammelserumalbumin, die wir nach den üblichen Vorschriften mittels Zusatz von Ammonsulfat bereiteten. Sera mit geringer Hämolyse haben wir jedesmal vor der Darstellung der einzelnen Proteinfractionen durch Schütteln mit Tierkohle gereinigt. Unsere Präparate wurden mit aller Sorgfalt von ihren Nachbarfractionen getrennt.

Für die Darstellung des maximaljodierten Jodserumalbumins A gilt alles für das Jodoalbumin Gesagte. Die Substanz ist ein fast weißes Pulver. Für eine durch n/10-Natronlauge hergestellte und völlig ausdialysierte Lösung dieser A-Substanz haben wir die Fällungsgrenze gegen Ammonsulfat bestimmt. 50 ccm der Lösung ergaben mit 20 ccm konzentrierter Ammonsulfatlösung starke Trübung, nach Zusatz weiterer 30 ccm war vollständige Ausflockung erfolgt. Das Jodserumalbumin A besitzt also als Natriumsalz die Fällungsgrenze eines Globulins (=  $\frac{1}{2}$ -Sättigung), eine Verschiebung, auf die der eine von uns (Blum) bereits früher hingewiesen hat.

Die Analysen des Jodserumalbumins A ergaben:

a) CH-Bestimmung (Präparat aus kristall. Pferdeserumalbumin):

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1476 \text{ g} &= 0,2564 \text{ g CO}_2 = 47,38\% \text{ C} \\ &= 0,0846 \text{ g H}_2\text{O} = 6,4\% \text{ H.} \end{aligned}$$

b) N-Bestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1772 \text{ g (Kjeld.)} &\text{ titr. n/5-Säure } 9,1 \text{ ccm} = 14,39\% \text{ N} \\ 0,1501 \text{ g (Dumas)} &= 18,4 \text{ ccm N (b = 761 mm, t = 15}^\circ) \\ &= 14,36\% \text{ N.} \end{aligned}$$

c) S-Bestimmung:

$$\text{Angew. } 0,1892 \text{ g BaSO}_4 = 0,0112 \text{ g} = 0,81\% \text{ S.}$$

d) Jodbestimmungen:

1.	Angew.	0,1583 g	titr. Thiosulfat	(f = 2,01) = 7,0 ccm = 14,07 mg Jod = 8,8% J.
		0,1364 g	" "	(f = 1,95) = 6,4 ccm = 12,48 mg Jod = 9,1% J.
2.	"	0,1666 g	" "	(f = 1,95) = 7,8 ccm = 15,21 mg Jod = 9,0% J.
3.	"	0,1839 g	" "	(f = 1,91) = 8,6 ccm = 16,42 mg Jod = 8,9% J.
		0,1717 g	" "	(f = 1,91) = 8,1 ccm = 15,471 mg Jod = 9,0% J.
4.	"	0,1104 g	" "	(f = 2,02) = 4,9 ccm = 9,898 mg Jod = 8,9% J.
		0,1583 g	" "	(f = 2,02) = 7,0 ccm = 14,14 mg Jod = 8,8% J.
5.	"	0,1538 g	" "	(f = 1,58) = 8,8 ccm = 13,904 mg Jod = 9,04% J.
		0,1582 g	" "	(f = 1,58) = 9,1 ccm = 14,378 mg Jod = 9,08% J.

Durchschnitt: 8,96% Jod (A-Zahl).

Das Jodserumalbumin B wurde durch mehrfache Umfällung der maximaljodierten Verbindung A mit  $\text{SO}_2$  gewonnen. Wir haben dabei — um Lösung in der Säure zu vermeiden — stets mit einem stärkeren Natriumsulfatzusatz gearbeitet. Die fast völlig weiße Substanz ergab analytisch folgende Werte:

a) CH-Bestimmung:

Angew. 0,1484 g = 0,2687 g  $\text{CO}_2$  = 49,38% C  
= 0,0916 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 7,4 % H.

b) N-Bestimmung (Dumas):

Angew. 0,1574 g = 19,5 ccm N (b = 756 mm, t = 15°) = 14,4% N.

c) S-Bestimmung:

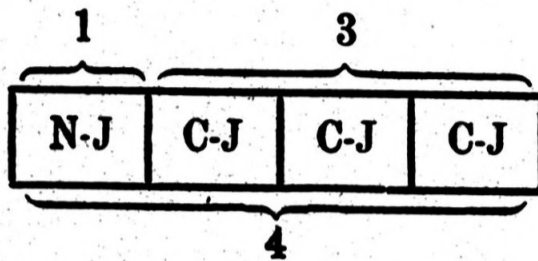
Angew. 0,1771 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,0124 g = 0,96% S.

d) Jodbestimmungen:

1.	Angew.	0,1248 g	titr. Thiosulfat	(f = 2,01) = 4,1 ccm = 8,241 mg Jod = 6,6% J.
2.	"	0,1012 g	" "	(f = 1,91) = 3,6 ccm = 6,876 mg Jod = 6,8% J.
		0,0711 g	" "	(f = 1,91) = 2,6 ccm = 4,966 mg Jod = 6,9% J.
3.	"	0,1531 g	" "	(f = 1,95) = 5,2 ccm = 10,14 mg Jod = 6,6% J.

4. Angew. 0,1285 g titr. Thiosulfat ( $f = 1,92$ ) = 4,5 ccm  
 = 8,64 mg Jod = 6,7% J.  
 0,1685 g " " (f = 1,92) = 6,0 ccm  
 = 11,52 mg Jod = 6,8% J.  
 Durchschnitt: 6,73% Jod (B-Zahl).

Der aus dem Vergleich von Jodserumalbumin A mit 8,96% Jod und B mit 6,73% Jod sich ergebende Prozentwert für N-Jod ( $8,96 - 6,73$ ) beträgt 2,23, woraus sich bei 6,73% Kernjod ein Verhältnis zwischen beiden von 1 : 3 mit weitgehender Genauigkeit errechnet.



In das maximaljodierte Serumalbumin sind also 4 Jodatome oder ein Vielfaches davon eingetreten, von denen je eines am Stickstoff sitzt.

Die Jodzahlen A und B sind für Pferde- und Hammelserumalbumin die gleichen.

Blum<sup>1)</sup> hat bei seinen ersten Darstellungen 11,02 bzw. 9,93% Jod erhalten. Blum und Umbach<sup>2)</sup> fanden als Mittel mehrerer Jodierungen 9,59%. Kurajeff<sup>3)</sup> erhielt in einer großen Reihe von Jodierungen in saurer Lösung Zahlen im Bereiche von 9,86—12,28%. Über eine von ihm in schwach alkalischer Lösung ausgeführte Jodierung, die einen Jodgehalt von 10,95 ergab, wird noch zu sprechen sein. Wir vergleichen einige Analysenzahlen Kurajeffs mit den unsrigen:

	K. (A 3)	K. (A 5)	K. (A 9)	Jodserumalbumin A
C	47,57	49,09	47,98	47,38
H	6,11	6,45	6,31	6,4
N	14,56	15,39	14,43	14,36
S	1,13	—	0,86	0,81
J	12,05	9,86	12,28	9,0 (8,96)

Auf „jodfrei“ umgerechnet, ergeben Kurajeffs Zahlen:

für C: (A 3) 54,05; (A 5) 54,4; (A 9) 54,6;  
 „ N: 16,55; 17,0; 16,36.

<sup>1)</sup> <sup>2)</sup> <sup>3)</sup> loc. cit.



Unsere A- und B-Substanzen zeigen dagegen folgende Werte:

für C:	(A) 52,06;	(B) 52,9;
„ N:	15,79;	15,4.

Dem entsprechen die Zahlen für genuines Pferdeserumalbumin (nach Abderhalden<sup>1)</sup>): C = 52,93 und N = 15,89 %.

Die Zahlen von Kurajeff sind zu hoch; die von ihm angewandte Methode liefert ein weitgehender verändertes Produkt als die unsrige.

Das Verhältnis C : N beträgt für das genuine Serumalbumin 3,888 bzw. 3,902; für Kurajeffs Zahlen berechnet es sich zu 3,811 bzw. 3,729 und 3,855; für unsere Zahlen ergibt sich der Wert 3,85 (Jodserumalbumin A).

Kurajeff errechnet auf Grund seiner Zahlen die Molekulargröße des Serumalbumins zu 10100 bis 10200. Unter Zugrundelegung von 2,21 % für jedes eingetretene Jodatome berechnen wir die Mindestmolekulargröße des Jodserumalbumins auf 5746, woraus sich für das Serumalbumin selbst der Wert 5620 ergibt.

Hier sei noch angemerkt, daß Krzemecki<sup>2)</sup> auch das koagulierte Serumalbumin in derselben Weise wie das Ovalbumin mit Jod behandelt und 24,5 % bzw. 14,0 % als Jodgehalt seiner Präparate gefunden hat.

Das Jodserumalbumin C wurde nach der oben beschriebenen Schnellmethode dargestellt.

Versuch I: Jodierung von 50 ccm Albuminlösung (= 0,5 g) bikarbonatalkalisch, 10 ccm 2n/Jodjodkalilösung, Temperatur 40°, Dauer 6 Minuten. Die Substanz wurde mit verdünnter Essigsäure gefällt; sie war vollkommen weiß, zeigte negative Millonsche, dagegen stark positive Ehrlich-Rohdesche und stark positive Schwefelblei-Reaktion.

Jodbestimmung: Angew. 0,1622 g titr. Thiosulfat ( $f = 2,05$ )  
= 5,5 ccm = 11,275 mg Jod = 6,9 % J.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 37, S. 495 (1903).

<sup>2)</sup> loc. cit.

**Versuch II: Verlauf und Bedingungen wie I, Dauer 9 Minuten.**

Jodbestimmung: Angew. 0,1693 g titr. Thiosulfat ( $f = 2,05$ )  
 $= 5,6 \text{ ccm} = 11,48 \text{ mg Jod} = 6,78\% \text{ J.}$

**Versuch III: wie vorher, Dauer 6 Minuten.**

(Angew. 100 ccm Lösung).

Jodbestimmung: Angew. 0,2656 g titr. Thiosulfat ( $f = 1,98$ )  
 $= 8,9 \text{ ccm} = 17,622 \text{ mg Jod} = 6,6\% \text{ J.}$

Die gleiche Substanz, nach Behandlung mit  $\text{SO}_2$ :

Angew. 0,2494 g titr. Thiosulfat ( $f = 1,98$ )  $= 8,3 \text{ ccm}$   
 $= 16,434 \text{ mg Jod} = 6,6\% \text{ J.}$

**Versuch IV: wie vorher, 6 Minuten.**

Angew. 0,1987 g titr. Thiosulfat ( $f = 1,95$ )  $= 6,8 \text{ ccm}$   
 $= 13,26 \text{ mg Jod} = 6,65\% \text{ J.}$

Durchschnitt:  $6,7\% \text{ Jod.}$

**CH-Bestimmung:**

Angew. 0,1448 g  $= 0,2588 \text{ g CO}_2 = 48,8\% \text{ C}$   
 $= 0,0837 \text{ g H}_2\text{O} = 6,42\% \text{ H}$

C, auf jodfrei berechnet, ergibt  $52,3\%.$

**N-Bestimmung:**

Eine hitzecoagulierte Substanz ergab (Kjeldahl):

Angew. 0,2664 g titr. n/10-Säure  $27,0 \text{ ccm} = 14,15\% \text{ N.}$

Diese Zahl, auf jodfrei umgerechnet, ergibt  $15,16\%$ , also einen etwas zu niedrigen Wert, der offenbar durch die Erhitzung der Substanz mit Wasser verursacht ist (vgl. die diesbezügliche Angabe von Blum und Umbach).

**S-Bestimmung:**

Angew. 0,1800 g  $\text{BaSO}_4 = 0,0240 \text{ g} = 1,8\% \text{ S.}$

Versuch III zeigt, daß bei der kontaktschnellen Jodierung kein Jod an den Stickstoff getreten ist. Die gefundenen Jodmengen bestätigen auch hier die durch  $\text{SO}_2$ -Einwirkung auf A-Substanzen erhaltene Kernjodzahl. Der Schwefel ist hier völlig erhalten. Zu bemerken ist noch, daß bereits bei 9 bis 10 Minuten Dauer der Jodierung die Ehrlich-Rohde-Probe schwächer wird, nicht aber die Schwefelbleiprobe. Das Umgekehrte tritt bei der Schnelljodierung des Caseins ein (s. d.).

Jodierung mit  $\text{MgCO}_3$ -Zusatz.

Kurajeff<sup>1)</sup> hat in einem seiner Versuche, wie oben bereits erwähnt, die Alkaleszenz der Serumalbuminlösung statt durch Natriumbikarbonat durch Magnesiumkarbonat erzeugt. Er fand dabei eine Substanz von folgender Elementarzusammensetzung:

$$\text{C} = 47,97; \text{H} = 6,18; \text{N} = 14,88; \text{S} = 1,44; \text{J} = 10,95.$$

Wir haben diesen Versuch wiederholt und durch Einwirkung von  $\text{SO}_2$  eine B-Substanz dargestellt: Hammelserumalbumin (400 ccm einer 1%igen Lösung) wurde mit 10 g  $\text{MgCO}_3$  versetzt, 2/n-Jodjodkalilösung zugefügt (Überschuß) und 2 mal 24 Stunden bei  $37^\circ$  digeriert. Fällung, Reinigung und Trocknung erfolgten wie bei unseren anderen Versuchen. Die Jodbestimmung ergab:

$$\begin{array}{l} \text{Angew. } 0,1613 \text{ g titr. Thiosulfat (f} = 1,86) = 9,7 \text{ ccm} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad = 18,042 \text{ mg Jod} = 11,1\% \text{ J.} \\ \qquad \qquad \qquad 0,1693 \text{ g } \text{,,} \text{,,} \qquad \qquad \qquad \text{(f} = 1,86) = 10,1 \text{ ccm} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad = 18,786 \text{ mg Jod} = 11,0\% \text{ J.} \end{array}$$

Unsere Zahlen stimmen also mit der von Kurajeff erhaltenen = 10,95 gut überein. Unsere aus dieser A-Substanz gewonnene B-Substanz zeigte folgenden Wert für Jod:

$$\begin{array}{l} \text{Angew. } 0,1055 \text{ g titr. Thiosulfat (f} = 1,65) = 4,7 \text{ ccm} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad = 7,755 \text{ mg Jod} = 7,3\% \text{ J} \\ \qquad \qquad \qquad 0,1450 \text{ g } \text{,,} \text{,,} \qquad \qquad \qquad \text{(f} = 1,65) = 6,4 \text{ ccm} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad = 10,56 \text{ mg Jod} = 7,3\% \text{ J.} \end{array}$$

Rechnet man Kurajeffs Werte für C und N auf jodfrei um, so erhält man

$$\begin{array}{l} \text{für C: } 53,8\% \text{ (genuin } 52,93) \\ \text{.. N: } 16,7\% \text{ (,, } 15,89). \end{array}$$

Beide Werte sind zu hoch. Auch das Verhältnis C:N ist beträchtlich verschoben. Es ergibt sich aus Kurajeffs Zahlen zu 3,761 (genuin 3,902). Diese Tatsachen sprechen für eine Spaltung des Proteinmoleküls. Beim Verlauf der Jodierung beobachteten wir eine beträchtliche Zunahme der Alkaleszenz, als deren Ursache sich durch Umsetzung von

<sup>1)</sup> loc. cit.

Magnesiumkarbonat mit Jodkali gebildetes Kaliumkarbonat herausstellte. Dies gab Veranlassung zu der Spaltung. Als wir zwar unter Zusatz von Magnesiumkarbonat, aber mit feingepulvertem Jodmetall ohne Jodkali jodierten, zeigte die hierbei gewonnene Substanz Werte, die zu unserer A-Zahl stimmen:

Angew. 0,2922 g	titr. Thiosulfat	(f = 1,65) = 15,3 ccm	
		= 25,245 mg Jod	= 8,7% J.
0,1836 g	„ „	(f = 1,65) = 9,7 ccm	
		= 16,01 mg Jod	= 8,5% J.

Weiterhin jodierten wir bei Gegenwart von Magnesiumkarbonat mit einer Jodjodcalciumlösung. Hierbei bildet sich  $\text{CaCO}_3$ . Die Fällung des Jodproteins wurde mit verdünnter Salzsäure vorgenommen; sodann wurde die Substanz aus verdünnter Natronlauge mit Essigsäure umgefällt. Ihre Analyse ergab einen Näherungswert an unsere A-Zahl:

Angew. 0,1391 g	titr. Thiosulfat	(f = 1,65) = 6,8 ccm	
		= 11,22 mg Jod	= 8,06% J.
0,1555 g	„ „	(f = 1,65) = 7,6 ccm	
		= 12,54 mg Jod	= 8,06% J.

Aus diesen Ergebnissen ziehen wir den Schluß, daß das Magnesiumkarbonat das Natriumbikarbonat behufs schonender Jodierung nur bei Zugabe von metallischem Jod zu vertreten vermag, worin wir aber keinen Vorteil, sondern nur eine Erschwerung des Verfahrens sehen. Jedenfalls vermag Kura-jeffs Versuch in keiner Weise unser Jodierungsergebnis und die daraus abgeleiteten Schlüsse abzuändern. Bei dem von ihm gewählten Verfahren spielt sich eine irreführende Spaltung durch Alkali ab.

### 3. Jodserumglobulin.

Wir haben das zur Jodierung zu verwendende Serumglobulin nach der Methode von Reye<sup>1)</sup> aus blutfreiem Hammel- und Pferdeserum gewonnen. Diese Methode bürgt für die Abwesenheit von Fibrinogen. Versuche zu einer weiteren Zerlegung des Globulins in Euglobulin und Pseudoglobulin

<sup>1)</sup> Vgl. dazu Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden IV. 1; 82.

haben wir nicht gemacht. Wir brachten das Serumglobulin so zur Jodierung, wie es sich nach vollständiger Dialyse seiner salzhaltigen Lösung ergab: als Gemenge eines in salzfreiem Wasser löslichen und unlöslichen Anteils. Bei der Darstellung des Jodserumglobulins A fällt fast sofort der größte Teil der Substanz aus; es muß daher die Jodierung unter stetem Umschütteln vorgenommen werden. Auch ist das gewonnene Jodprotein nicht klar in Alkali löslich. Das gereinigte Produkt ist von hellgelber Farbe; als getrocknetes Pulver ist es nur noch schwach gelb gefärbt. Wir erhielten bei der Analyse folgende Werte:

## a) CH-Bestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1438 \text{ g} &= 0,2509 \text{ g CO}_2 = 47,58\% \text{ C} \\ &= 0,0782 \text{ g H}_2\text{O} = 6,04\% \text{ H.} \end{aligned}$$

## b) N-Bestimmung (Dumas):

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1368 \text{ g} &= 16,7 \text{ ccm N (b = 758 mm, t = 17°)} \\ &= 14,14\% \text{ N.} \end{aligned}$$

## c) S-Bestimmung:

$$\text{Angew. } 0,1852 \text{ g BaSO}_4 = 0,0108 \text{ g} = 0,8\% \text{ S.}$$

## d) Jodbestimmungen:

## 1. (Hammel)

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1156 \text{ g titr. Thiosulfat (f = 2,013)} &= 4,8 \text{ ccm} \\ &= 9,662 \text{ mg Jod} = 8,3\% \text{ J.} \\ 0,1347 \text{ g „ „ (f = 2,013)} &= 5,5 \text{ ccm} \\ &= 11,0715 \text{ mg Jod} = 8,2\% \text{ J.} \end{aligned}$$

## 2. (Pferd)

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,2325 \text{ g titr. Thiosulfat (f = 1,98)} &= 9,8 \text{ ccm} \\ &= 19,404 \text{ mg Jod} = 8,4\% \text{ J.} \end{aligned}$$

Durchschnitt: 8,3% (A-Zahl).

Bei der Darstellung des Jodserumglobulins B konnten wir beobachten, daß nach der ersten Einwirkung von SO<sub>2</sub> die Löslichkeit in Alkali zunahm. Um das sehr störende Zusammenballen der Substanz zu vermeiden, wurde hier der Niederschlag erst bei der letzten Fällung auf das Filter gebracht, vorher dagegen stets nur dekantiert. Die Farbe des Jodserumglobulins hellt sich bei der SO<sub>2</sub>-Behandlung auf; das fertige trockene Produkt erscheint nunmehr schwach gelblich. Die Analysen dieser Substanz ergaben:

## a) N-Bestimmung (Dumas):

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1411 \text{ g} &= 17,45 \text{ ccm N (b = 755 mm, t = 17^\circ)} \\ &= 14,31\% \text{ N.} \end{aligned}$$

## b) S-Bestimmung:

$$\text{Angew. } 0,1774 \text{ g} = 0,0110 \text{ g BaSO}_4 = 0,85\% \text{ S.}$$

## c) Jodbestimmungen:

1.	Angew. 0,1270 g	titr. Thiosulfat	(f = 2,013) = 4,1 ccm	= 8,253 mg Jod = 6,5% J.
	0,1627 g	„	„ (f = 2,013) = 5,4 ccm	= 10,87 mg Jod = 6,6% J.
2.	„ 0,2048 g	„	„ (f = 1,98) = 7,0 ccm	= 13,86 mg Jod = 6,7% J.
3.	„ 0,3173 g	„	„ (f = 1,82) = 11,7 ccm	= 21,294 mg Jod = 6,7% J.
4.	„ 0,2061 g	„	„ (f = 1,92) = 7,2 ccm	= 13,824 mg Jod = 6,7% J.

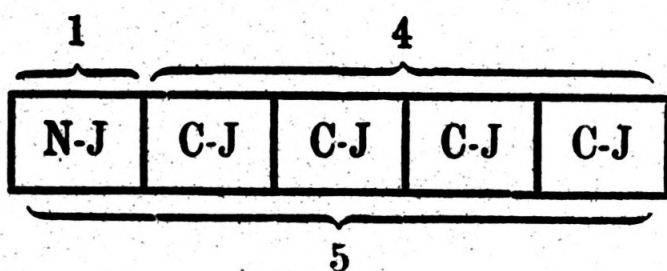
Durchschnitt: 6,64% (B-Zahl).

Unsere Werte für C und N, auf jodfrei umgerechnet, ergeben:

$$\begin{aligned} \text{für A: C} &= 51,94 \text{ (genuin: } 52,71\% \text{)}, \text{ N} = 15,43 \text{ (genuin: } 15,8\% \text{)}; \\ \text{„ B:} & \qquad \qquad \qquad \text{N} = 15,33. \end{aligned}$$

Das genuine Verhältnis C:N beträgt 4,027; wir finden für A den Wert 3,941. Die Jodzahlen der Serumglobuline von Hammel und Pferd zeigen keine Unterschiede.

Der Vergleich der Zahlen für A mit 8,3% und B mit 6,64% J ergibt an eingetretenem N-Jod  $(8,3 - 6,64) = 1,66\%$ , woraus sich ableiten läßt, daß in der B-Substanz, d. h. am Kohlenstoff 4 Jodatome ( $4 \times 1,66 = 6,64$ ) kerngebunden sind. Das Strukturbild stellt sich demnach folgendermaßen dar:



Die Mindestmolekulargröße des Jodserumglobulins berechnet sich, wenn einem Jodatome ein Prozentgehalt von 1,66 entspricht, auf 7651. Dem Serumglobulin selbst kommt eine solche von 7525 zu.

Das Serumglobulin ist bisher nur von Blum<sup>1)</sup> jodiert worden. Blum fand für Serumglobulin aus Ochsenblut eine Jodzahl von 8,4% (S = 0,66%, N = 14,40%).

#### 4. Jodthyreoglobulin.

Das Thyreoglobulin benützten wir zu unseren Untersuchungen, obwohl gemäß der oft bestätigten Feststellung des einen von uns (Blum) in ihm nur ein Gemisch von verschieden hoch jodiertem natürlichem Jodprotein vorliegt, in der Erkenntnis, daß die Volljodierung dennoch zu einem einheitlichen Produkt führen könne. Das Ausgangsmaterial gewannen wir aus Schilddrüsen von Hammeln und von Pferden. 100 Schilddrüsen wurden fettfrei präpariert, in der Fleischmaschine zermahlen und 3 mal je 1 Stunde auf der Schüttelmaschine mit je 1 Liter physiol. Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Talkum durchgeschüttelt und durch ein Papierwollefilter gesaugt. Sodann wurde das Rohthyreoglobulin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt und durch Auswaschen mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung und mehrfaches Umfällen (3–4 mal) gereinigt. Die Lösung, die bei anhaltender Dialyse gegen destilliertes Wasser keine Spur einer „globulin“-artigen Ausscheidung zeigte, diente, nunmehr völlig salzfrei, zur Jodierung. Die Gewinnung des Jodthyreoglobulins A erfolgte, wie dies für die anderen Jodproteine beschrieben ist. Hier ist zu bemerken, daß die Ausfällung der Substanz mit Essigsäure stets durch Zusatz von Natriumsulfat verbessert wurde. Das Jodthyreoglobulin A ist ein schwach gelblich gefärbtes Pulver; seine Analysen ergaben:

a) CH-Bestimmung (Substanz aus Hammelschilddrüsen):

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1410 \text{ g} &= 0,2500 \text{ g CO}_2 = 48,36\% \text{ C} \\ &= 0,0835 \text{ g H}_2\text{O} = 6,63\% \text{ H.} \end{aligned}$$

b) N-Bestimmung (Kjeldahl):

$$\text{Angew. } 0,1212 \text{ g titr. n/5-Säure } 6,2 \text{ ccm} = 14,33\% \text{ N.}$$

c) S-Bestimmung:

$$\text{Angew. } 0,1800 \text{ g} = 0,0116 \text{ g BaSO}_4 = 0,88\% \text{ S.}$$

<sup>1)</sup> loc. cit.

## d) Jodbestimmungen:

## 1. (Hammel):

Angew. 0,0864 g titr. Thios.	(f = 2,05)	= 2,7 ccm	= 5,535 mg J
			= 6,4% J.
" 0,2696 g " "	(f = 1,915)	= 8,8 ccm	= 16,852 mg J
			= 6,21% J.

## 2. (Hammel):

Angew. 0,1827 g " "	(f = 1,915)	= 5,6 ccm	= 10,724 mg J
			= 5,8% J.
" 0,1402 g " "	(f = 1,95)	= 4,5 ccm	= 8,6175 mg J
			= 6,14% J.

## 3. (Hammel):

Angew. 0,1490 g " "	(f = 1,95)	= 4,6 ccm	= 8,97 mg J
			= 6,02% J.
" 0,2175 g " "	(f = 1,95)	= 6,8 ccm	= 13,26 mg J
			= 6,09% J.

## 4. (Pferd)

Angew. 0,1493 g " "	(f = 1,95)	= 4,7 ccm	= 9,165 mg J
			= 6,13% J.
" 0,2236 g " "	(f = 1,95)	= 7,0 ccm	= 13,65 mg J
			= 6,10% J.

## 5. (Pferd):

Angew. 0,1784 g " "	(f = 1,915)	= 5,6 ccm	= 10,72 mg J
			= 6,0% J.
" 0,2177 g " "	(f = 1,915)	= 7,1 ccm	= 13,59 mg J
			= 6,2% J.
" 0,1845 g " "	(f = 1,915)	= 6,1 ccm	= 11,68 mg J
			= 6,33% J.

Durchschnitt: 6,14% Jod (A-Zahl).

Das Jodthyreoglobulin B erhielten wir aus A gleich den übrigen B-Substanzen. Wir haben in diesem Falle die Umfällung mit  $\text{SO}_2$  aus ammoniakalischer Lösung bewirkt. Bei der Analyse dieser fast weißen Substanz erhielten wir die Zahlen:

## a) CH-Bestimmung:

Angew. 0,1487 g	= 0,2665 g $\text{CO}_2$	= 48,88% C
	= 0,0948 g $\text{H}_2\text{O}$	= 7,0 % H.

## b) N-Bestimmung (Dumas):

Angew. 0,1415 g	= 17,5 ccm (b = 755 mm; t = 18°)
	= 14,29% N.

## c) S-Bestimmung:

Angew. 0,1688 g	= 0,0125 g $\text{BaSO}_4$	= 1,02% S.
-----------------	----------------------------	------------



## d) Jodbestimmungen:

## 1. (Hammel):

Angew. 0,1656 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 4,0 ccm = 8,2 mg J  
 = 4,95% J.

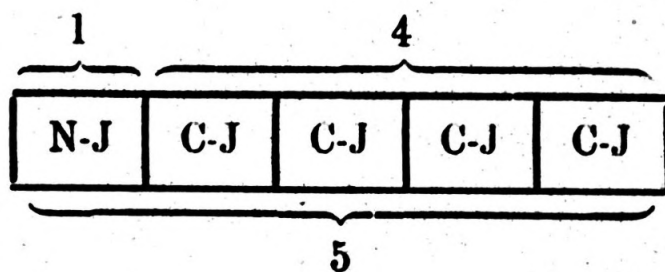
" 0,2327 g " " ( $f = 2,05$ ) = 5,5 ccm = 11,27 mg J  
 = 4,84% J.

## 2. (Pferd):

Angew. 0,2812 g " " ( $f = 1,95$ ) = 7,0 ccm = 13,65 mg J  
 = 4,85% J.

Durchschnitt: 4,88% Jod (B-Zahl).

Der Vergleich der beiden Jodzahlen A und B ergibt das Verhältnis von 4 : 5, wobei zu bemerken ist, daß die Grenze der A- und B-Werte nahe an dem Verhältnis 3 : 4 liegt. Unsere analytischen Ergebnisse entscheiden jedoch für das erstere. Das Strukturbild läßt sich folgendermaßen darstellen:



Die Mindestmolekulargröße des mit Jod gesättigten Thyreoglobulins berechnet sich unter der Annahme, daß jedem Jodatome ein Prozentgehalt von 1,26 entspricht, auf 10080.

Rechnet man unsere C- bzw. N-Zahl auf jodfrei um, so erhält man:

für A: C = 51,55 (genuin: 51,94), N = 15,27 (genuin: 15,32);

„ B: C = 51,39 N = 15,04.

Mit unserer A-Zahl stimmt die von Blum<sup>1)</sup> erhaltene Zahl 6,0% bzw. 6,6 und 5,8% überein. Einen Unterschied der Thyreoglobuline verschiedener Herkunft zeigen unsere Jodierungsergebnisse nicht.

Auch vom Thyreoglobulin gelang es uns, ein Thyreoglobulin C nach der Schnellmethode zu erhalten. Die Versuchsdauer war 6 Minuten. Die Reaktion nach Millon wurde negativ; die Reaktion nach Ehrlich-Rohde und die Schwefelbleiprobe blieben stark positiv. Das Präparat war völlig weiß. Analytisch ergaben sich folgende Werte:

<sup>1)</sup> loc. cit.

## a) CH-Bestimmung:

Angew. 0,1326 g = 0,2396 g CO<sub>2</sub> = 49,2% C.

0,0799 g H<sub>2</sub>O = 6,7% H.

## b) N-Bestimmung (Dumas):

Angew. 0,1463 g = 18,2 ccm N (b = 761 mm, t = 17°)

= 14,46% N.

## c) S-Bestimmung:

Angew. 0,1852 g = 0,0187 g BaSO<sub>4</sub> = 1,3% S.

## d) Jodbestimmung:

Angew. 0,2313 g titr. Thios. (f = 1,98) = 5,8 ccm = 11,48 mg J

= 4,96% J.

Es ergibt sich also die gleiche Jodzahl, wie bei der B-Substanz. Der S-Wert ist deutlich verbessert. Bei der Umrechnung des C- und N-Wertes auf jodfrei erhält man:

$$C = 51,78\% \text{ und } N = 15,3\%.$$

## 5. Jodcasein.

Das Casein („Caseinogen“) ist bereits häufig jodiert worden, aber die Angaben über seine Jodzahl sind sehr widersprechend. Blum und Vaubel<sup>1)</sup> fanden 6,7% Jod. Liebrecht<sup>2)</sup> fand für sein „Perjodcasein“ 17,8%, für ein Jodcasein 5,7% und für „Caseojodin“ 8,7%. Oswald<sup>3)</sup> hat Casein in der Kälte jodiert (unter Zusatz von Natronlauge) und den Jodgehalt des so erhaltenen Produktes zu 14,39% bestimmt. Weder die Jodierungsmethode von Oswald, noch seine Reinigung des erhaltenen Produktes entsprechen den Anforderungen, die man an ein wohlumschriebenes Jodprotein stellen muß.

Zuletzt hat Krzemecki<sup>4)</sup> ein Jodcasein mit einem Jodgehalt von 17,37% hergestellt. Die im folgenden mitzuteilenden Ergebnisse sind in vorläufigen Versuchen gewonnen; sie beanspruchen deshalb ein Interesse, weil sie zeigen, daß beim Casein von einer „doppelten Jodzahl“ nicht gesprochen werden kann. Das jodierte Casein verhält sich auch insofern anders, wie unsere vorher beschriebenen Jodproteine, als seine

<sup>1)</sup> loc. cit.

<sup>2)</sup> Berichte Bd. 30, S. 1824 (1897).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 95, S. 351 (1915).

<sup>4)</sup> loc. cit.

Jodzahl eine gewisse Labilität zeigt: während die A-Zahl unserer Jodsubstanzen sich nicht ändert, gleichviel ob man das Produkt aus seiner Alkaliverbindung mit Essigsäure oder Schwefelsäure ausfällt, und während sie erst in die B-Substanz übergehen, wenn man sie mit  $\text{SO}_2$  behandelt, tritt eine — wenn auch verhältnismäßig kleine — Abnahme des Jodwertes bei Jodcasein bereits bei Umfällung mit verdünnter Schwefelsäure ein: es ergibt sich dieselbe Zahl, mag man nur mit Schwefelsäure fällen oder auch mit schwefliger Säure. Wir geben die von uns erhaltenen Jodwerte unserer Präparate, die im übrigen nach der geschilderten Methode erhalten wurden. Unser Ausgangsmaterial war stets nach Hammarsten gereinigtes Casein (Merck).

### I. Substanzen ohne Umfällungen.

#### a) Ausdialysiert, durch Aceton gereinigt.

Angew. 0,1027 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 4,1 ccm = 8,40 mg J  
= 8,3% J.

0,1344 g " " ( $f = 2,05$ ) = 6,5 ccm = 11,27 mg J  
= 8,1% J.

#### b) Aus Eisessiglösung durch Wasser gefällt.

Angew. 0,1231 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 4,8 ccm = 9,84 mg J  
= 7,9% J.

0,1504 g " " ( $f = 2,05$ ) = 5,7 ccm = 11,68 mg J  
= 7,7% J.

#### c) Mit verdünnter Essigsäure gefällt und mit Wasser gewaschen.

Angew. 0,0837 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 3,7 ccm = 6,58 mg J  
= 7,86% J.

### II. Substanzen mit $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Umfällungen.

#### a) Essigsäurefällung, $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Fällung.

Angew. 0,1316 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 4,5 ccm = 9,22 mg J  
= 7,0% J.

0,1022 g " " ( $f = 2,05$ ) = 3,5 ccm = 9,17 mg J  
= 7,0% J.

#### b) Dialyse der alkalischen Lösung, mehrfache Umfällung mit $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Angew. 0,2055 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 7,1 ccm = 14,96 mg J  
= 7,0% J.

### III. Substanzen mit $\text{SO}_2$ -Behandlung.

a) Angew. 0,1903 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 6,7 ccm = 13,73 mg J  
= 7,09% J.

0,1682 g titr. Thios. ( $f = 2,05$ ) = 5,8 ccm = 11,89 mg J  
= 7,06% J.

b) Angew. 0,0859 g „ „ ( $f = 2,05$ ) = 2,9 ccm = 5,94 mg J  
= 6,9% J.

0,0891 g „ „ ( $f = 2,05$ ) = 3,1 ccm = 6,35 mg J  
= 7,1% J.

#### IV. Jodierung nach der Schnellmethode, Dauer 9 Minuten, mit einmaliger $\text{SO}_2$ -Behandlung.

Angew. 0,1819 g titr. Thios. ( $f = 1,915$ ) = 7,3 ccm = 13,979 mg J  
= 7,6% J.

Diese Substanz zeigte starke Reaktion nach Ehrlich-Rohde, gab aber eine negative Schwefelbleiprobe.

Eine Stickstoffbestimmung (Kjeldahl) an Substanz IIIb ergab:

Angew. 0,1364 g = 15,88 ccm n/10-Säure = 14,3% N.

Diese Zahl, auf jodfrei umgerechnet, ergibt 15,4% (genuin 15,65%). Der Gesamtdurchschnitt der von uns erhaltenen Jodwerte für das jodierte Casein beträgt 7,51%; eine doppelte Jodzahl besitzt das Casein nicht. — Unter der Voraussetzung, daß 7,51% Jodgehalt des Caseins bedingt ist durch den Eintritt von 2 Jodatomen in das Molekül, berechnet sich die Mindestgröße des Jodcaseins mittels der Gleichung  $7,51 : 100 = 254 : x$  auf „3382“.

#### 6. Jodierungsversuch mit Glutin.

Da das Glutin, wie die Hydrolyse ergibt, kein Tyrosin, nur 0,4% Phenylalanin und 0,4% Histidin enthält, so ist eine erheblichere intramolekulare Jodbindung bei diesem Protein unwahrscheinlich, wenn nicht noch andere Aminosäuren als jodbindend in Betracht kommen. Oswald<sup>1)</sup> hat zuerst das Glutin zu jodieren versucht und an seinen Präparaten einen Jodgehalt von 1,4 bis 2,0% festgestellt<sup>2)</sup>. Wir haben den Versuch wiederholt und die Behandlung mit  $\text{SO}_2$  angeschlossen. Als Ausgangsmaterial diente uns beste weiße

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge Bd. 3, S. 514 (1903).

<sup>2)</sup> Vgl. auch das negative Ergebnis der Bromierung: Salkowski, Diese Zeitschr. Bd. 57, S. 527 (1908).

Handelsgelatine, die wir nach dem Verfahren von St. Faust<sup>1)</sup> gründlichst reinigten. Nach 20-stündiger Einwirkung von 2/n-Jodjodkalilösung in bikarbonatalkalischer Lösung entfernten wir den Jodüberschuß durch Thiosulfat, säuerten mit verdünnter Essigsäure an, wobei nichts ausfiel, und fällten mit dem 1½-fachen Volumen Aceton. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in destilliertem Wasser gelöst und nach langanhaltender Dialyse dieser Lösung abermals durch Aceton 1:1 gefällt. Diese Fällung wurde in sehr wenig Wasser gelöst und in absoluten Alkohol, der mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert war, eingegossen. Die abfiltrierten Flocken wurden mit absolutem Alkohol gewaschen, dann mit Äther behandelt und getrocknet. Die Analyse des weißen Pulvers ergab:

Angew. 0,1822 g titr. Thios.	(f = 2,05)	= 0,3 ccm	= 0,615 mg J
			= 0,4% J.
0,1662 g „ „	(f = 2,05)	= 0,4 ccm	= 0,82 mg J
			= 0,4% J.

Ein weiterer Teil der ausdialysierten wäßrigen Lösung der Substanz wurde mit SO<sub>2</sub> versetzt und mehrere Tage stehen gelassen. Sodann wurde mit verdünntem Alkali neutralisiert, mit Essigsäure wieder angesäuert und nach abermaliger langanhaltender Dialyse die Fällung mit Aceton und die Reinigung durch absoluten Alkohol, sowie die Trocknung in der bereits geschilderten Weise bewirkt. Die Analyse dieser Substanz ergab in zwei Versuchen:

1. Angew. 0,2404 g titr. Thios.	(f = 2,05)	= 0,25 ccm	= 0,51 mg J
			= 0,21% J.
0,3799 g „ „	(f = 2,05)	= 0,4 ccm	= 0,82 mg J
			= 0,21% J.
2. Angew. 0,1677 g „	n/100 (f = 2,204)	= 2,5 ccm	= 0,51 mg J
			= 0,3% J.
0,1602 g „	n/100 (f = 2,204)	= 2,4 ccm	= 0,49 mg J
			= 0,3% J.

<sup>1)</sup> Vgl. Abderhaldens Handbuch d. bioch. Arbeitsmethoden IV 1, S. 181.

## Tabellarische Übersicht.

	Jodgehalt der			Verhältnis		Mindest- molekular- größe
	„A“-Sub- stanz	„B“-Sub- stanz	„C“-Sub- stanz	von NJ zu CJ		
Jodovalbumin . .	7,55	5,12	4,91	1	2	5060
Jodserumalbumin	8,96	6,73	6,7	1	3	5746
Jodserumglobulin	8,3	6,64	—	1	4	7651
Jodthyreoglobulin	6,14	4,88	4,96	1	4	10 080
Jodcasein . . . .	7,51			0	2?	3382

## 7. Das Verhalten der Jodproteine (A und B) gegenüber Pepsinsalzsäure.

Die Prüfung der im vorstehenden beschriebenen Jodproteine auf ihre Löslichkeit durch Pepsinsalzsäure wurde mit einer Verdauungslösung vorgenommen, die etwa 0,3 g Pepsin (Merck) auf 500 ccm einer 0,3 %igen Salzsäure gelöst enthielt. Alle Substanzen gelangten in gleicher Menge nach vollständiger Reinigung und Trocknung (Alkohol oder Aceton ausgekocht, Äther getrocknet) zur Prüfung. Die Wirksamkeit unserer Pepsinsalzsäure wurde stets durch einen Vergleichsversuch mit koaguliertem Serumalbumin erprobt. Jedem Versuch wurde Toluol zugesetzt. Die Digestionstemperatur betrug 37,5 °; die Menge der zugefügten Pepsinsalzsäure wählten wir so groß, daß die positive Congoreaktion nicht verschwand. Zur Erreichung der Hitzesperrung gegenüber Pepsinsalzsäure genügte eine Erhitzung in wäßriger Suspension auf 70—75 ° während einer Dauer von mehreren Stunden, wobei auf stete gute Durchmischung der Substanz geachtet wurde (es war vorteilhaft, stets kleine Portionen anzuwenden). Unsere Versuche ergaben folgende Resultate:

a) Jodserumalbumin A (8,8 %) und B (6,6 %):

A) nach 5 Stunden: ungelöst,

.. 20 .. : gelöst,

B) .. 2½ .. : gelöst,

R) (2 Stunden auf 75 ° erhitzt):

nach 4½ Stunden: ungelöst,

.. 5 .. : ungelöst,

.. 6 .. : ungelöst,

.. 20 .. : beginnende Lösung.

## b) Jodserumglobulin A (8,4 %) und B (6,7 %):

- A) nach 4 Stunden: ungelöst,  
 „ 8 „ : ungelöst,  
 „ 24 „ : ungelöst,  
 „ 30 „ : beginnende Lösung.  
 B) „  $\frac{3}{4}$  „ : gelöst,  
 „  $1\frac{1}{2}$  „ : klar gelöst,  
 B) (2 Stunden auf 75° erhitzt):  
 nach 6 Stunden: ungelöst.

## c) Jodoalbumin A (7,5 %) und B (5,0 %):

- A) nach 5 Stunden: ungelöst,  
 „ 24 „ : Spuren beginnender Lösung,  
 B) „ 5 „ : vollkommen gelöst,  
 B) (2 Stunden auf 70° erhitzt):  
 nach 5 Stunden: ungelöst,  
 „ 24 „ : ungelöst.

## d) Jodthyreoglobulin A (6,6 %) und B (4,95 %):

- A) nach 3 Stunden: beträchtliche Lösung,  
 „ 20 „ : klar gelöst,  
 B) „ 3 „ : gelöst,  
 „ 5 „ : klar gelöst,  
 B) (2 Stunden auf 70° erhitzt):  
 nach 5 Stunden: ungelöst.

## e) Jodcasein (7,0 %):

- nach 5 Stunden: gelöst.  
 Dieselbe Substanz, 2 Stunden auf 70° erhitzt:  
 nach 20 Stunden: ungelöst.

Alle durch Hitze gesperrten Substanzen gewannen nach Umfällung aus alkalischer Lösung ihre Löslichkeit in Pepsinsalzsäure wieder.

Beim Überblicken unserer Versuche fällt auf, daß Jodserumglobulin und Jodoalbumin (wie auch Jodglobin, vgl. die folgende Mitteilung von E. Strauß und R. Grützner) die Hemmung der A-Substanzen gegenüber Pepsinsalzsäure am deutlichsten zeigen, Jodthyreoglobulin die Erscheinung nicht oder nur bedeutend schwächer darbietet, während bei Serumalbumin A die vorhandene Hemmung ziemlich schnell aufgehoben wird. Die Sperrung durch Hitzeeinwirkung aber zeigt sich bei allen bisher geprüften Jodproteinen (B-Substanzen) in gleicher Weise stark.

### Zusammenfassung.

1. Viele Proteine nehmen außer an Ringkohlenstoff fest sich bindendem Jod auch solches auf, das das Wasserstoffatom einer (Ring-)Imidgruppe ersetzt. Letzteres Jod wird unschwer durch Reduktion mit  $\text{SO}_2$  aus seiner Bindung gelöst.
2. Das N-Jod steht in konstantem Verhältnis zu dem C-Jod und ermöglicht dadurch die Berechnung der Zahl der C-Jodatome und der Mindestmolekulargröße des jeweiligen Proteinmoleküls. Auch konstitutive Besonderheiten lassen sich ableiten.
3. Unter der Annahme, daß der Imidazolring des Histidins den Träger des N-Jods darstellt, lassen sich über die Verteilung des Histidins und des Tyrosins im Eiweißmolekül gewisse Wahrscheinlichkeitsschlüsse ziehen.
4. Bei der Jodierung der Proteine vollziehen sich Substitutionen und daneben auch Oxydationen, bei denen eine Biuretgruppe abiuret wird und der Tryptophan- und der Cystinkomplex nachweisbar verändert werden, wobei  $\text{CHJ}_3$  auftritt. Durch frühzeitige Unterbrechung der Jodierung — unmittelbar nach vollendeter Substitution des Tyrosins — werden die meisten sekundären Veränderungen des Moleküls hintangehalten. Die resultierenden Jodproteine besitzen sämtliche Ringkohlenstoff-Jodatome, wie bei maximaler Jodierung und sind in ihrem Alkalisalt abbiuret. Sie sind aber frei von N-Jod; der Tryptophan- und der Cystinarm sind unzerstört und  $\text{CHJ}_3$  ist nicht entstanden.
5. Der Eintritt von N-Jod in das Molekül und die Erhitzung des Jodproteins nach Entfernung seines N-Jods machen die Jodproteine unzugänglich für die peptische Verdauung. Ein basischer Eiweißanteil wird abgesperrt.