

**133. Richard Kuhn, Nils Andreas Sörensen und Leonhard Birkofe: Über die Eisenproteide der Milz; der Bauplan des Ferritins.**

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung Heidelberg,  
Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 20. Juni 1940.)

Die alte Frage, auf welche Weise die Milz am Eisenstoffwechsel beteiligt ist, hat V. Laufberger<sup>1)</sup> durch eine ausgezeichnete Untersuchung entscheidend gefördert. Es gelang ihm mit Hilfe von Cadmiumsulfat aus Pferdemilz ein prachtvoll krystallisierendes Eisenproteid, das er Ferritin benannte<sup>2)</sup>, zu gewinnen. Der erstaunlich hohe Eisengehalt (20.0% Fe) macht das Speicherungsvermögen<sup>3)</sup> der Milz für dieses Metall verständlich.

**I. Untersuchung der Milz verschiedener Tiere.**

Nach dem von V. Laufberger angegebenen Verfahren konnten wir krystallisiertes Ferritin leicht isolieren aus der Milz von Pferd, Hund, Katze und Schakal (Abbild. 1). Gar kein Ferritin war dagegen zu gewinnen aus der Milz von Meerschweinchen, Kaninchen und aus derjenigen eines Wals, obwohl die Organe dieser Tiere ebenfalls reich an Eisen sind. Bei der Aufarbeitung zeigte sich, daß beim Erhitzen der Milzauszüge auf 80° im Falle von Meerschweinchen, Kaninchen und Wal praktisch alles Eisenproteid koagulierte, so daß die überstehende Lösung kaum noch gefärbt war. Bei den Ferritin enthaltenden Milzen bleibt beim Erhitzen auf 80° das Ferritin über der auftretenden Fällung mit tiefbrauner Farbe in Lösung. Der bestehende Unterschied scheint nicht durch Mitreißen erklärbar. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß man zwischen 2 Arten von Eisenproteiden in der Milz zu unterscheiden hat: Solchen, die beim Erhitzen auf 80° koagulieren und bisher bei allen Tierarten aufgefunden worden sind, und anderen, die bei dieser Temperatur in Lösung bleiben und nur bei gewissen Tieren vorkommen (Ferritin).

**II. Prüfung des Ferritins auf katalytische Wirkungen.**

Aus dem Ferritin läßt sich, wie bereits V. Laufberger gezeigt hat, durch verd. Salzsäure alles Eisen als Ferri-Ion abspalten. Auch mit Hilfe von  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl war es uns nicht möglich, daneben noch Ferro-Ionen nachzuweisen.

Reduktionsmitteln gegenüber ist das Ferritin äußerst beständig. Die Überführung der Ferri- in die Ferro-Stufe war unter den von uns eingehaltenen Bedingungen stets von einer Abspaltung des Eisens bzw. einer Denaturierung des Proteids begleitet (katalytische Hydrierung mit Platin bei Zusatz von 3 HCl auf 1Fe; Reduktion mit Natriumhydrosulfit unter Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$ ; Jodwasserstoffsäure).

In Anbetracht dieser Tatsachen ist es nicht verwunderlich, daß alle im Versuchsteil auszugsweise wiedergegebenen Bemühungen, katalytische Wirkungen des krystallisierten Ferritins aus Pferdemilz festzustellen (Katalase-,

<sup>1)</sup> Bull. Soc. Chim. biol. **19**, 1575 [1937].

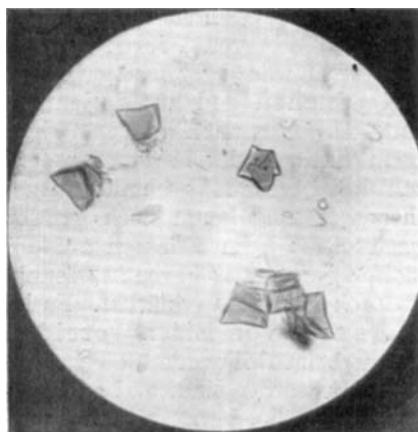
<sup>2)</sup> Unter dem Namen Ferratin sind amorphe, eisenärmere Eisenalbuminate bereits von O. Schmiedeberg, Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **33**, 101 [1894], beschrieben worden.

<sup>3)</sup> L. Asher, Biochem. Ztschr. **55**, 13 [1913].

Peroxydase-, Tyrosinase-, Aldehyd-dehydrase-, Aldehyd-mutase-Wirkung), völlig ergebnislos waren. Das Ferritin ist ein besonders schönes Beispiel für die Erkenntnis, daß das Eisen nur dann die Funktion eines biologischen Katalysators ausüben vermag, wenn es Gelegenheit hat, immer wieder seinen Valenzzustand zu ändern.

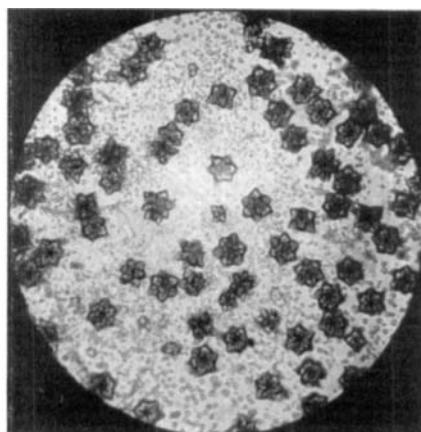
### III. Zusammensetzung und Bindungsart des Eisens.

Nach V. Laufberger enthält Ferritin 20.0% Fe, 9.9% N und 0.9% P. Wir selbst fanden 21.1% Fe, 10.4% N und 1.20% P. Bei der Dialyse gegen *n*-Salzsäure wurde gleichzeitig mit dem Eisen auch aller Phosphor abgespalten. Das zurückgebliebene, nicht dialysierbare Protein enthielt nur



Abbild. 1a.

Ferritin aus der Milz eines Schakals (*Canis aureus* L.). „Tetraedrische“ Form der Krystalle.



Abbild. 1b.

Ferritin aus Pferdemilz. Eisenreichstes Präparat (Fe = 24.4%). Meistbeobachtete pseudokubische Form.

noch 0.01% P. Der Schwefel-Gehalt des eisenfreien Proteins betrug 0.88%, die durch Cystein- und Methionin-Bestimmung quantitativ gedeckt wurden. Schwefelsäureester kommen danach im Ferritin nicht vor.

Nach Hydrolyse des kryst. Ferritins durch 6-*n*. Schwefelsäure konnten wir neben Ferrisulfat, Phosphorsäure und zahlreichen Aminosäuren noch Guanin nachweisen und die Anwesenheit von Adenin, Thymin und Cytosin wahrscheinlich machen. Ferner fanden wir einen reduzierenden Zucker, der nicht die Farbreaktionen der Pentosen (Furfurol) gab und vermutlich Desoxyribose ist. Es liegt somit ein eisenhaltiges Nucleoprotein vor. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß aus der Milz von P. A. Levene und J. A. Mandel<sup>14)</sup> bereits Thymonucleinsäure isoliert worden ist, die aus Cytosin, Thymin, Guanin, Adenin, Desoxyribose und Phosphorsäure aufgebaut ist.

<sup>14)</sup> Biochem. Ztschr. 5, 33 (1907).

Die Bestimmung des Reduktionsvermögens nach der Säurehydrolyse des Ferritins spricht für einen Gehalt von 5.7% an Desoxyribose. Nimmt man an, daß der gesamte P-Gehalt des Ferritins (1.20%) den Nucleinsäure-Gruppen angehört, also auf 1 P-Atom 1 Desoxyribose (Mol.-Gew. 134) trifft, so sollte das Ferritin  $(1.2 \times 134) : 31 = 5.2\%$  Desoxyribose liefern, was mit dem gefundenen Wert gut übereinstimmt. Es ist somit wahrscheinlich, daß aller Phosphor den Nucleinsäuren des Ferritins zuzuordnen ist und daß andersartige Phosphorsäureester (etwa Serinphosphorsäure, vergl. Casein) fehlen.

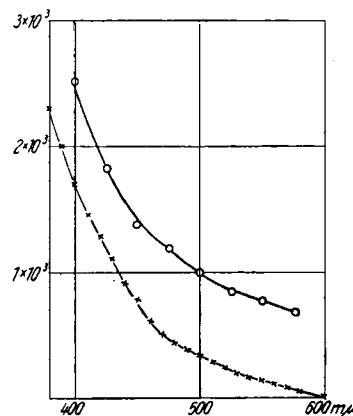
Unter der Annahme, daß wie in der Thymonucleinsäure (Mol.-Gew. 1253,  $C_{39}H_{51}O_{25}N_{15}P_4$ ) Cytosin, Thymin, Guanin und Adenin in äquimolaren Mengen vorkommen, berechnet sich aus dem P-Gehalt des Ferritins (1.20% P) ein Gehalt von  $(1.20 \times 1253) : (4 \times 31.04) = 12.1\%$  Nucleinsäure = 5.1% Purin- und Pyrimidin-Basen.

Der N-Gehalt des Ferritins (10.4%) setzt sich somit aus dem N-Gehalt der Aminosäuren und demjenigen der Nucleinsäure wie folgt zusammen:  $(12.1 \times 15 \times 14) : 1253 = 2.03\%$  N als Nucleinsäure und  $10.4 - 2.0 = 8.4\%$  N als Protein. Der Umrechnungsfaktor 6.50 (entspr. einem N-Gehalt des eisen- und nucleinsäurefreien Proteins von 15.5%) ergibt  $8.4 \times 6.5 = 54.5$  Gew.-% Protein im Ferritin.

Diese Zahlen ermöglichen die Entscheidung, ob das Eisen im Ferritin als  $Fe(OH)_3$  oder als  $FeOOH$  „vorliegt“. 21.1% Fe entsprechen 40.3%  $Fe(OH)_3$  aber nur 33.6%  $FeOOH$ . Nachdem nun im Ferritin 12.1% Nucleinsäure und 54.5% Protein vorkommen, verbleiben für die Eisenkomponente  $100 - 54.5 - 12.1 = 33.4\%$ . Diese Zahl stimmt mit der für  $FeOOH$  berechneten überein. Damit ist eine erste Bilanz gewonnen, die das Ferritin formell in 3 Bausteine zu zerlegen erlaubt:

54.5% Protein  
12.1% Nucleinsäure  
33.4%  $FeOOH$  (Goethit).

Der Bindungszustand des Eisens kommt auch im Absorptionsspektrum des Chromoproteids zum Ausdruck. Die lichtelektrisch gemessene Absorptionskurve des Ferritins (Abbild. 2) zeigt kein Maximum, sondern steigt von 600 bis 400 m $\mu$  stetig an. Sie ist derjenigen von Ferrisalzlösungen, die nahezu bis auf den Neutralpunkt abgepuffert sind, sehr ähnlich. In Abbild. 2 haben wir zum Vergleich die Absorptionskurve von  $Fe(NO_3)_3$  in Acetatpuffer von pH 6.6 nach Messungen von J. Cathala und J. Cluze<sup>5)</sup> mit aufgetragen. Die lichtelektrisch gemessene Ferritin-Lösung enthielt 2.08 mg Fe/ccm (Fe : N = 2.63). Die Ordinaten  $\epsilon_{molar}$  geben an  $(2.30 \times \log J_0/J) : (c \times d)$  für Lösungen, die je 0.558 mg Fe/ccm enthielten.



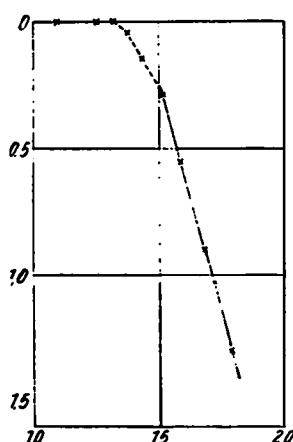
Abbild. 2. Absorptionsspektrum von Ferritin (x—x) und von Ferricnitrat bei pH 6.6 (o—o). Erklärung der Ordinaten im Text.

<sup>5)</sup> Compt. rend. Acad. Sciences 203, 401 [1936].

Beim Vergleich von Ferritin-Präparaten, deren Eisengehalt verschieden war, ergab sich, daß die Lichtabsorption dem Eisengehalt annähernd proportional war:

$\lambda$	$\epsilon$ für Lösg. A	$\epsilon$ für Lösg. B	$\epsilon_A : \epsilon_B$	$Fe_A : Fe_B$
400 $\mu\mu$	84.0	75.0	1.12 : 1	1.08 : 1
410 $\mu\mu$	72.5	65.0	1.12 : 1	
420 $\mu\mu$	63.5	54.5	1.16 : 1	
430 $\mu\mu$	55.5	48.0	1.15 : 1	
440 $\mu\mu$	44.5	39.0	1.14 : 1	
450 $\mu\mu$	40.0	34.5	1.16 : 1	

Die Fällung des Ferritins durch Ammonsulfat findet nach Laufberger statt zwischen 15 und 20 g  $(NH_4)_2SO_4$ , die man 100 ccm der wäßrigen Lösung zusetzt. Die Fällungsgrenzen fand er abhängig von der Konzentration des Ferritins (je verdünnter die Lösung, um so mehr  $(NH_4)_2SO_4$  war erforderlich).



Abbild. 3. Ammonsulfat-Fällungskurve. Abszissen: Molarität von  $(NH_4)_2SO_4$ . Ordinaten:  $\log x (1 \text{ cm})$ .

Eigene Versuche haben die in Abbild. 3 dargestellte Fällungskurve ergeben, in der die Ordinaten (in Lösung gebliebenes Ferritin, stufenphotometrisch bestimmt) nach dem Vorbilde von S. P. L. Sörensen-E. Cohn logarithmische Werte darstellen. Die Geradlinigkeit des Abfalls einer solchen Kurve gilt als Kriterium für die Einheitlichkeit des untersuchten Proteins.

#### IV. Die Aminosäuren des Ferritins.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob der hohe Eisengehalt mit einem ebenso hohen Gehalt an irgendeiner für die Bindung des Metalls speziell verantwortlichen Aminosäure zusammenhängt. Wir haben nach dem von R. Kuhn und P. Desnuelle<sup>6)</sup> für das „gelbe Ferment“ entwickelten Verfahren, nach schwefelsaurer Hydrolyse, eine Reihe von Aminosäuren quantitativ bestimmt. Das Ergebnis (Tafel 1) zeigt, daß keine einzige Aminosäure in so großen Mengen vorkommt, daß sie in einfache stöchiometrische Beziehung zum Eisen gesetzt werden könnte. 1 Arginin — diese Aminosäure steht mengenmäßig an der Spitze — müßte rd. 8 Atome Fe binden können. Nimmt man an, daß es sich bei der Summe der in unserer Bilanz fehlenden Aminosäuren nur um eine einzige, für die Bindung des Eisens entscheidende, handelt — was nicht wahrscheinlich ist —, so müßte jeder Rest auch dieser noch unbekannten Aminosäure weit mehr als 1 Fe zu binden vermögen. Die Gesetzmäßigkeit, nach der das Eisen vom Protein aufgenommen wird, ist offensichtlich von anderer Art.

#### V. Der Bauplan des Ferritins.

Die wiederholte Darstellung von Ferritin aus der Milz verschiedener Pferde und zahlreiche Fraktionierungsversuche mit den erhaltenen Präparaten, die seit  $2\frac{1}{2}$  Jahren von uns durchgeführt worden sind, haben die Erkenntnis gebracht, daß der Fe-Gehalt der schwerlöslichen, sehr schön

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. P. Desnuelle, B. 70, 1907 [1937].

Tafel 1.  
Aminosäuren im Ferritin.

	Hydrolyse I		Hydrolyse II		Mittelwert	
	% N	% Gew.	% N	% Gew.	% N	% Gew.
Ammoniak . . . . .	11.6	—	11.2	—	11.4	—
Amino-N . . . . .	55.0	—	59.5	—	57.3	—
Kathodischer N . . . . .	32.3	—	32.1	—	32.2	—
Arginin*) . . . . .	28.7	10.1	31.0	11.1	29.9	10.6
Arginin**) . . . . .	27.2	9.5	25.8	9.2	26.5	9.3
Histidin . . . . .	0.60	0.25	0.60	0.25	0.60	0.25
Lysin**) . . . . .	3.7	2.2	5.0	2.9	4.4	2.5
Amino-N . . . . .	10.7	—	11.7	—	11.2	—
(Anode + Mitte)-N . . . . .	42.1	—	41.4	—	41.7	—
Amino-N . . . . .	33.5	—	—	—	33.5	—
Nichtamino-N (Prolin + Oxyprolin)	8.2	—	—	—	8.2	—
Glykokoll . . . . .	1.78	1.06	1.82	1.10	1.80	1.08
Tyrosin . . . . .	4.6	6.6	4.15	6.1	4.4	6.4
Phenylalanin . . . . .	0.70	0.93	0.70	0.93	0.70	0.93
Tryptophan . . . . .	1.2	0.92	1.2	0.92	1.2	0.92
Dicarbonsäure-N . . . . .	3.6	—	3.3	—	3.4	—
Cystin***) . . . . .	1.15	1.10	1.09	1.05	1.12	1.07
Methionin***) . . . . .	1.31	1.50	1.30	1.48	1.31	1.49

\*) Colorimetrisch bestimmt.

\*\*) Aus der Stickstoffverteilung nach D. D. van Slyke berechnet.

\*\*\*) Aus der Analyse des eisenfreien Proteins auf Ferritin umgerechnet.

krystallisierenden Fraktionen bis zu 24% betragen kann, daß sich aber so eisenreiches Ferritin nicht aus der Milz jeden Tieres gewinnen läßt. Wir haben den Eindruck, daß Fe = 24% einen oberen Grenzwert darstellt. Es wäre sehr erwünscht gewesen, möglichst alle Versuche an Ferritin-Präparaten, die diesen maximalen Eisengehalt aufweisen, durchzuführen, doch standen uns davon nicht genügende Mengen zur Verfügung.

Am interessantesten unter allen Aminosäuren ist das Histidin, von dem wir nur 0.25% gefunden haben, entsprechend 1 Mol Histidin in 62000 g Ferritin. Nimmt man an, daß die „chemische Einheit“ des Eisenproteids 2 Mol. Histidin enthält, dann sind darin sehr wahrscheinlich 72 Mol. Arginin, 24 Mol. Lysin, 18 Mol. Glykokoll, 6 oder 8 Mol. Phenylalanin, 48 Mol. Tyrosin, 12 Mol. Cystein, 12 Mol. Methionin, 24 Atome Schwefel, 48 Atome Phosphor und 470 Atome Eisen bzw. 576 Atome Eisen (für Ferritin von 24% Fe) enthalten.

Da nur 54.5% des Ferritins Protein sind, kommt 1 Mol Histidin auf  $62000 \times 0.545 = 33800$  g Eiweißkomponente, was dem Doppelten der Svedberg-Einheit entspricht. Die Untersuchung des Ferritins in der Ultrazentrifuge, die ebenso wie eine Röntgenuntersuchung der Krystalle wichtige Ergebnisse verspricht, wird wohl zeigen, aus wievielen solcher Einheiten sich die Teilchen des Eisenproteids wirklich zusammensetzen,

Besonders bemerkenswert ist die Zahl der Peptidbindungen, die auf 1 Mol. Histidin treffen. Von den 10.4% N des Ferritins gehören 7% (0.73% N) freien Aminogruppen an, die sich ohne Hydrolyse nach D. D. van

Slyke nachweisen lassen. Im Hydrolysat des Ferritins sind 72% des Gesamtstickstoffs (7.5% N) nach van Slyke erfaßbar, wovon 4% (0.42% N) auf Purin- und Pyrimidin-Basen entfallen. Auf 1 Mol. Histidin treffen somit

$$\frac{62000 \times 10.4 \times (72 - 7 - 4)}{14 \times 100 \times 100} = 281 \text{ Peptidbindungen.}$$

Es folgt daraus, daß die Zahl der Eisenatome (gef. 235) derjenigen der Peptid-Bindungen (gef. 281) nahekommt. Berücksichtigt man, daß das analysierte Präparat nur 21% Fe enthält, der maximal gefundene Fe-Gehalt jedoch 24% beträgt, so wird die Übereinstimmung für das mit Eisen „gesättigte“ Nucleoproteid noch besser  $(235 \times 24) : 21 = 270$ . Im Grenzfall vermag sehr annähernd jede Peptidbindung 1 Eisenatom festzuhalten.

Tafel 2.

Baustein	Formel (Mol.-Gew.)	Gew.-% gef. (Mittelwert)	n <sub>gef.</sub>	n <sub>wahrseh.</sub>
Arginin .....	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (174.1)	9.95	<b>35.5</b>	72
Histidin .....	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> (155.1)	0.25	<b>1.0</b>	2
Lysin .....	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (146.1)	2.50	<b>10.6</b>	24
Glykokoll .....	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N (75)	1.08	<b>8.9</b>	18
Phenylalanin .....	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> N (165.1)	0.93	<b>3.5</b>	6 (8)
Tyrosin .....	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N (181.1)	6.40	<b>22.0</b>	48
Tryptophan .....	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (204.1)	0.92	(2.8)	(6)
Cystein .....	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> NS (121)	1.07	<b>5.6</b>	12
Methionin .....	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> NS (149.1)	1.49	<b>6.2</b>	12
Schwefel .....	S (32.0)	0.61	<b>11.8</b>	24
Phosphor .....	P (31.0)	1.20	<b>24.0</b>	48
Eisen .....	Fe (55.85)	21.1	<b>235</b>	2 × 288
Peptid-N .....	N (14.0)	6.35	<b>281</b>	2 × 288

Nach den von D. Wrinch<sup>7)</sup> angestellten Betrachtungen kommt der Zahl 288 eine besondere Bedeutung beim Aufbau vieler Proteine zu. Sie gibt an, wieviele Aminosäurebausteine in einem Protein vorkommen, das sich aus 2 Svedberg-Einheiten zusammensetzt. Es ist festzustellen, daß die von uns durch rein chemische Analyse des Ferritins gefundenen „Äquivalente“ für den Gehalt an Eisen und an Peptid-Bindungen von der Zahl 288, die theoretisch ermittelt worden ist, nur wenig abweichen.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1. Darstellung und Elementaranalysen.

Nach der von V. Laufberger gegebenen Vorschrift wurde die Milz eines Pferdes (1.58 kg) durch die Fleischmaschine getrieben und der Brei mit 3.2 l Wasser bei etwa 20° 2 Stdn. stehengelassen. Der abzentrifugierte Rückstand wurde nochmals mit 3.2 l Wasser 2 Stdn. digeriert. Die vereinigten Auszüge

<sup>7)</sup> D. Wrinch, Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 2005 [1938]; D. Wrinch u. I. Langmuir, Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 2247 [1938]; D. Wrinch, Science [New York] **85**, 566 [1937]; Trans. Faraday Soc. **33**, 1368 [1937]; I. Langmuir u. D. Wrinch, Nature (London) **143**, 49 [1939]; M. Bergmann u. C. Niemann, Journ. biol. Chem. **118**, 301 [1937]; C. Niemann, Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. **6**, 58 [1938].

wurden (in Anteilen von 1.5 l) unter kräftigem Rühren in ein siedendes Wasserbad gestellt, bis die Temperatur eben 80° erreichte. Sobald die Temperatur auf 68 bis 70° gestiegen war, fielen begleitende Proteine in reichlicher Menge aus, von denen noch heiß abgesaugt wurde. Das klare, tief rotbraune Filtrat (5 l), in dem sich das Eisenproteid befand, wurde nun nach V. Laufberger zunächst mit 10% (0.5 kg) Ammonsulfat p. a. versetzt, wobei man eine hellbraune Vorfällung erhielt, die in der Zentrifuge abgetrennt wurde. Hierauf wurde das Ferritin durch Erhöhung der Ammonsulfatkonzentration auf 30% (weiterer Zusatz von 1 kg) gefällt.

Das amorphe Rohprodukt wurde mit 102 ccm dest. Wasser 1 Stde. gerührt und eine geringe Menge Substanz, die nicht in Lösung ging, abzentrifugiert. Dann gab man bei 0° 102 ccm eiskalte 10-proz. Cadmiumsulfatlösung zu und ließ bei etwa 20° stehen. In allen Fällen gelang die Krystallisation des Ferritins unter diesen Bedingungen. Sie war meist nach 24 Stdn. beendet. Beim Zentrifugieren setzten sich die derben, tiefbraunen, spezifisch schweren Krystalle des Ferritins am Boden ab, darüber eine hellere, amorphe Schicht eines Begleitproteids, das sich durch Schlämmen mit 2-proz. Cadmiumsulfatlösung von den Ferritinkristallen abtrennen ließ. Die Ausbeute betrug in dieser Stufe 0.9 bis 1.2 g Ferritin aus 1 kg frischer Milz. Zur Reinigung wurde über Nacht mit Wasser (etwa 400 ccm auf 1 g) geschüttelt bzw. gerührt, von etwas schwerlöslichem, hellbraunem amorphen Proteid, das bei der ersten Krystallisation eingeschlossen wurde, abzentrifugiert und im Cellophanschlauch gegen doppelt dest. Wasser, das täglich 3- bis 4-mal erneuert wurde, dialysiert. Trat bei der Dialyse eine ganz schwache Trübung auf, so ließ sich diese mittels einer hochtourigen Zentrifuge (15000 U./Min.) beseitigen. Die Dialyse galt als beendet, wenn auf Zusatz von Bariumchlorid zur Außenflüssigkeit selbst nach mehrstündigem Stehenlassen keine Spur einer Trübung (Bariumsulfat) mehr auftrat. Das war in der Regel nach 5—8 Tagen der Fall.

Die so dargestellten Lösungen dienten zur Bestimmung der im Ferritin enthaltenen Aminosäuren. Solche Lösungen hinterlassen beim vorsichtigen Verdunsten über Phosphorpentooxyd im Exsiccator das Eisenproteid in amorphem Zustande, durch Versetzen mit dem gleichen Vol. 10-proz. Cadmiumsulfatlösung kann jedoch das Ferritin jederzeit wieder in herrlich ausgebildeten Krystallen gewonnen werden.

Das spezifische Drehungsvermögen des Ferritins läßt sich mit Rücksicht auf die hohe Farbstärke in üblicher Weise nicht genau bestimmen. Wir können nur sagen, daß die optische Aktivität vermutlich von derselben Größenordnung wie bei vielen anderen Proteinen sein dürfte und der Eisengehalt keinen abnorm hohen Wert bedingt.  $[\alpha]_{D}^{20}$ :  $(\pm 0.04^{\circ} \times 100) : (0.13 \times 1) = \pm 30^{\circ}$  (Wasser).

Der Gehalt an Fe, N und P stimmt annähernd mit den von V. Laufberger gefundenen Zahlen überein. Zur Analyse wurde bei etwa 20° über  $P_2O_5$  unter 1 mm zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Präparat	Asche %	Fe %	N %	P %
Ferritin Laufberger .....	32.5	20.0	9.9	0.94
Ferritin B I .....	27.3	17.2	11.3	—
Ferritin B II .....	30.1	19.0	10.5	1.04
Ferritin B III.....	30.35	21.1	10.4	1.21

Präparat B I: 5.717 mg Sbst.: 1.557 mg Asche. — 1.96 mg Sbst.: 0.336 mg Fe (colorimetrisch). — 2.86 mg Sbst.: 2.30 ccm  $n/100$ -HCl (Kjeldahl). — Präparat B II:

5.328 mg Sbst.: 1.600 mg Asche. — Je 2.664 mg Sbst.: 2.00 und 2.02 ccm  $n/_{100}$ -HCl (Kjeldahl). — 2.664 mg und 5.328 mg Sbst.: 0.0642 mg und 0.1283 mg  $P_2O_5$  (Lohmann-Jendrassik<sup>8</sup>). Präparat B III: 18.317 mg Sbst.: 5.623 mg Asche. — Je 18.317 mg Sbst.: 7.00 und 6.80 ccm  $n/_{100}$ - $Na_2S_2O_3$  (nach Aufschluß mit Salpeterschwefelsäure nach A. Neumann<sup>9</sup>), jodometrisch titriert.) = 3.91 und 3.80 mg Fe. — Je 9.15 mg Sbst.: 6.78 und 6.77 ccm  $n/_{100}$ -HCl (Kjeldahl). Je 9.15 mg Sbst.: 0.252 und 0.252 mg  $P_2O_5$  (Lohmann-Jendrassik). —

Bestimmung des Peptid-Stickstoffs: Je 5.328 mg natives Ferritin B III in 2 ccm Wasser: 0.035 und 0.035 ccm  $N_2$  (755 mm, 21°, D. D. van Slyke) = 7.0% des Gesamtstickstoffs. Je 5.28 mg Ferritin nach 24 Stdn. Hydrolyse (100°) mit 6-n. Schwefelsäure: 0.337 und 0.342 ccm  $N_2$  (755 mm, 24°; D. D. van Slyke) = 72% und 74% des Gesamtstickstoffs.

## 2) Zuckerbestimmung.

3 ccm einer Lösung, die 2.25 mg des aus Ferritin durch Hydrolyse gewonnenen Zuckers enthielten, gaben nach 2-stdg. Erhitzen im Wasserbad mit 3 ccm konz. Salzsäure + 3 ccm Wasser, Ausschütteln mit Benzol und Zusatz von 1 ccm 0.5-proz. Benzidin-Lösung<sup>10</sup>) keine Farbreaktion auf Pentose. Mit 2 mg Arabinose trat unter denselben Bedingungen sofort tief rotviolette Färbung ein. Desoxyribose gibt, da sie kein Furfurol bilden kann, die Benzidinreaktion auf Pentosen nicht. Auch die Farbreaktion mit Anilinacetat<sup>11</sup>) fiel mit der aus Ferritin gewonnenen Zuckerslösung negativ aus. Mit  $\alpha$ -Naphthol in konz. Schwefelsäure trat schwache Rotfärbung ein.

165 mg Ferritin B III wurden  $2\frac{1}{2}$  Stdn. mit 20 ccm  $n/_{10}$ -Schwefelsäure unter Rückfluß gekocht, das Eisen mit Bariumhydroxyd in geringem Überschuß gefällt, das überschüssige  $Ba(OH)_2$  mit Schwefelsäure genau entfernt und auf 10 ccm gebracht. 1 ccm (2 ccm) dieser Lösung verbr. 1.44 ccm (2.47 ccm)  $n/_{200}$ - $Na_2S_2O_3$  (A. Fujita und I. Iwatake<sup>12</sup>) = 0.252 mg (0.430 mg) Glucose. — 303 mg Ferritin B III wurden 24 Stdn. mit 40 ccm 6-n. Schwefelsäure hydrolysiert und nach Entfernung des Eisens auf 10 ccm gebracht. Je 1 ccm dieser Lösung verbrauchte 3.30 und 3.30 ccm  $n/_{200}$ - $Na_2S_2O_3$  = 0.574 mg (0.574 mg) Glucose.

Vergleichende Zuckerbestimmung: 6.052 mg Hefeadenylsäure (Adenosin-3'-phosphorsäure) wurden mit 10 ccm 20-proz. Salzsäure 20 Stdn. gekocht und nach dem Neutralisieren auf 20 ccm gebracht. 1 ccm (2 ccm) dieser Lösung verbr. 0.25 ccm (0.48 ccm)  $n/_{200}$ - $Na_2S_2O_3$  = 0.87 mg (0.84 mg) Glucose aus 6.05 mg Sbst. statt ber. 2.62 mg Pentose. — 8.261 mg Hefeadenylsäure wurden mit 10 ccm  $n/_{10}$ -Schwefelsäure  $2\frac{1}{2}$  Stdn. gekocht und nach dem Neutralisieren auf 10 ccm gebracht. 1 ccm (0.5 ccm) dieser Lösung verbr. 0.76 ccm (0.38 ccm)  $n/_{200}$ - $Na_2S_2O_3$  = 1.32 mg (1.32 mg) Glucose aus 8.26 mg Sbst. statt ber. 3.57 mg Pentose. — 6.906 mg Thymonucleinsäure wurden  $2\frac{1}{2}$  Stdn. mit 10 ccm  $n/_{10}$ -Schwefelsäure hydrolysiert, neutralisiert und auf 10 ccm gebracht. Je 1 ccm ergab bei der Titration 0.075 mg (0.075 mg) Glucose = 0.75 mg Glucose aus 6.906 mg Sbst. statt ber. 2.96 mg Desoxypentose. — 7.517 mg Thymonucleinsäure wurden 20 Stdn. mit 10 ccm 6-n. Schwefelsäure hydrolysiert, neutralisiert und auf 20 ccm gebracht. Je 2 ccm dieser Lösung entsprachen 0.092 (0.092) mg Glucose = 0.92 mg Glucose aus 7.517 mg Sbst. statt ber. 3.24 mg Desoxypentose.

<sup>8</sup>) K. Lohmann u. L. Jendrassik, Biochem. Ztschr. **178**, 419 [1926].

<sup>9</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **37**, 120 [1902]; **43**, 33 [1904]; E. Abderhalden, Handbuch d. biolog. Arbeits-Methoden Abt. I, Chem. Methoden, Tl. 3, Allgem. analyt. Methoden, S. 775.

<sup>10</sup>) R. A. Mc. Cance, Biochem. Journ. **20**, 1111 [1926].

<sup>11</sup>) G. E. Youngburg u. G. W. Pucher, Journ. biol. Chem. **61**, 741 [1924]; G. E. Youngburg u. K. Suminokura, Biochem. Journ. **14**, 347 [1931].

<sup>12</sup>) Biochem. Ztschr. **242**, 46 [1931].

## 3) Purin- und Pyrimidin-Basen.

1.5 g Ferritin wurden mit 10 ccm 6-n. Schwefelsäure 24 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Neutralisieren mit Barytwasser und Waschen des Bariumsulfats mit heißem Wasser wurde die abzentrifugierte klare Lösung eingeengt und auf 100 ccm gebracht. Diese nunmehr eisenfreie Lösung haben wir mit 3 ccm konz. Schwefelsäure und 100 ccm 10-proz. Phosphorwolframsäure versetzt. Nach 1-stdg. Erhitzen auf dem Wasserbad wurde 24 Stdn. im Eisschrank aufbewahrt, worauf das Phosphorwolframat abzentrifugiert und mit 5-proz. Schwefelsäure gewaschen wurde. Bei der Analyse von Nucleoproteiden gehen in den Phosphorwolframsäure-Niederschlag neben den Hexonbasen (Arginin, Histidin, Lysin) auch die Purin-Basen (Guanin, Adenin) sowie die Pyrimidinbase Cytosin, während Uracil und Thymin in Lösung bleiben<sup>13)</sup>. Das Phosphorwolframat wurde mit kryst. Ba(OH)<sub>2</sub> zerlegt, das Filtrat auf 15 ccm gebracht und mit 10-proz. Mercuriacetatlösung gefällt. Hierbei gehen laut Literatur<sup>13)</sup> die Purinbasen, Cytosin und Histidin in den Niederschlag. Wir haben diesen unter Zusatz von 2 Tropfen konz. HNO<sub>3</sub> in etwa 20 ccm Wasser gelöst, von ganz wenig unlöslichem abfiltriert und die auf etwa 5 ccm eingeengte Lösung mit 20-proz. Silbernitratlösung vorsichtig gefällt, bis kein weiterer Niederschlag mehr auftrat.

Nach 12 Stdn. (Eisschrank) hatten sich 52 mg Silbersalz in schönen weißen Nadelchen abgeschieden. Laut Literatur<sup>13)</sup> gehen in diesen Niederschlag nur noch Adenin und Guanin. Wir haben das krystallisierte Silbersalz in wenig heißem Wasser gelöst, mit H<sub>2</sub>S zerlegt und das Filtrat zur Trockne gebracht. Ein Teil des Rückstandes diente zur Ausführung der Murexid-Reaktion, die stark positiv ausfiel (Adenin gibt keine Murexid-Reaktion), der Rest wurde in etwa 1 ccm Wasser gelöst und mit gesättigter, wäßriger Pikrinsäure-Lösung versetzt, wobei sofort ein schwerlösliches Pikrat in schönen eigelben Nadelchen ausfiel.

Das schwach salpetersaure Filtrat des Silbersalzes wurde genau mit Bariumhydroxyd neutralisiert und der erhaltene Niederschlag von Silber und Barium befreit. Nach dem Einengen im Exsiccator auf ein kleines Volumen schied sich eine weiße krystalline Substanz (10 mg) ab, welche wie Cytosin positive Murexid-Reaktion und ein in gelben Nadelchen krystallisierendes Pikrat gab. Es ist zu berücksichtigen, daß in Lösung gebliebenes Guaninsilber dieselben Reaktionen geben würde.

Das Filtrat des Phosphorwolframsäure-Niederschlags wurde mit Amylalkohol-Äther 1:1 von überschüssiger Phosphorwolframsäure befreit, mit 2-n. Natronlauge neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und mit 10-proz. Mercuriacetatlösung versetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde an der Zentrifuge gewaschen, in Wasser suspendiert, mit H<sub>2</sub>S zerlegt und das auf 1—2 ccm eingeengte Filtrat nach Zugabe verd. Natronlauge mit kryst. Diazobenzol-*p*-sulfonsäure versetzt, wobei sich ein orangefarbiger Azokörper bildete.

Zum Vergleich haben wir ein Gemisch von 0.810 g Casein (Hammarsten), 0.181 g Thymonucleinsäure und 1.575 g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> + 9H<sub>2</sub>O, dessen Gehalt an Protein, Nucleinsäure und Eisen 1.50 g Ferritin entsprach, in genau gleicher Weise hydrolysiert und auf Purin- und Pyrimidinbasen untersucht. Die Mengen und Eigenschaften des erhaltenen Silbersalzes (~50 mg) und der Pikrate entsprachen den aus Ferritin erhaltenen. Auch die Farbreaktion auf Thymin mit Diazobenzolsulfonsäure fiel mit der zerlegten Mercuriacetatlösung so aus wie im Versuch mit Ferritin.

**Fällung durch Ammonsulfat:** Zu den in Abbild. 3 wiedergegebenen Messungen diente eine Ferritinlösung, die 1.048 mg Fe/ccm enthielt. Je 3.00 ccm dieser Lösung wurden mit Ammonsulfatlösung und Wasser bei 20° auf ein Gesamtvolume von 7.00 ccm gebracht. Nach dem Abzentrifugieren haben wir das in Lösung verbliebene Ferritin am Stufenphotometer ( $d = 1 \text{ cm}$ ) bestimmt.

<sup>13)</sup> P. A. Levene u. J. A. Mandel, Biochem. Ztschr. 5, 33 [1907]; G. Klein, Handbuch d. Pflanzenanalyse IV/1, III, Verlag Springer, Berlin [1933], S. 133.

Ferritin (ccm)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ccm)	Wasser (ccm)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Molarität)	$\chi$ korrig. (1 cm)	$\chi$ (Mittel)
3.00	2.37	1.63	1.261	1.019	1.019
3.00	2.49	1.41	1.325	1.025	1.017
3.00	2.49	1.41	1.325	1.009	
3.00	2.60	1.40	1.384	0.894	
3.00	2.60	1.40	1.384	0.893	0.894
3.00	2.72	1.28	1.447	0.721	
3.00	2.72	1.28	1.447	0.722	0.722
3.00	2.84	1.16	1.513	0.533	
3.00	2.84	1.16	1.513	0.528	0.530
3.00	3.00	1.00	1.596	0.281	
3.00	3.00	1.00	1.596	0.275	0.278
3.00	3.15	0.85	1.676	0.121	
3.00	3.15	0.85	1.676	0.133	0.127
3.00	3.25	0.75	1.730	0.095	
3.00	3.25	0.75	1.730	0.092	0.094
3.00	3.35	0.65	1.783	0.048	
3.00	3.35	0.65	1.783	0.052	0.050

#### 4) Bestimmung der Aminosäuren.

Die Hydrolyse des Ferritins erfolgte durch 6-n. Schwefelsäure, die Bestimmung der gebildeten Aminosäuren wurde nach der von R. Kuhn und P. Desnuelle<sup>6)</sup> angegebenen Methode durchgeführt.

##### Hydrolyse I.

344 mg Ferritin (N = 10.3 %, Fe = 21.1 %) wurden mit 15 ccm 6-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  29 Stdn. unter Rückfluß gekocht. 2.858 mg Ferritin: 2.30 ccm  $n/100$ -HCl entspr. 0.322 mg N<sub>2</sub> (11.3 % N<sub>2</sub>).

Ammoniak. 3.2 ccm  $n/10$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  entspr. 4.48 mg N<sub>2</sub> (Gesamtvolumen 120 ccm).

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 1.70 ccm  $n/100$ -HCl;  $1.70 \times 0.14 \times 120 = 28.5$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm der Lösung gaben 0.31 ccm N<sub>2</sub> (20°, 753 mm);  $0.31 \times 120/2 \times 1.128 = 20.8$  mg. Nach zwei Elektrodialysen von 100 ccm fanden wir in K<sub>II</sub> (kathodische Lösungen auf 25 ccm eingeengt):

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 2.90 ccm  $n/100$ -HCl;  $2.90 \times 0.14 \times 25 \times 120/100 = 12.18$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm Lösung gaben 0.245 ccm N<sub>2</sub> (20°, 753 mm);  $0.245 \times 25 \times 120/200 \times 1.128 = 4.15$  mg Aminostickstoff.

Arginin. a = 0.1 ccm, d = 0.25 cm; D = 45, k = 0.347 entspr. 115 γ Arginin;  $0.115 \times 25 \times 10 \times 120/100 = 34.6$  mg Arginin (11.1 mg N).

Histidin. Von 25 ccm wurden 11.5 ccm auf 2 ccm eingeengt und colorimetriert. a = 2 ccm, d = 0.5 cm, D = 60.8, k = 0.216 entspr. 650 γ Histidin;  $650 \times 25 \times 120/2 \times 11.5 \times 100 = 849$  γ Histidin (230 γ N als Histidin).

##### Stickstoffverteilung nach van Slyke.

$$A + H + L = 12.18 \text{ mg} \quad A + L = 11.95 \text{ mg}$$

$$\frac{A}{4} + \frac{H}{3} + L = 4.15 \text{ mg} \quad 3A + 12L = 48.88 \text{ mg}$$

$$H = 0.230 \text{ mg} \quad L = 1.45 \text{ mg}$$

$$3A + 12L = 48.88 \text{ mg} \quad A = 10.50 \text{ mg}$$

$$3A + 3L = 35.85 \text{ mg}$$

$$9L = 13.03 \text{ mg}$$

L (Anode und Mitte auf 100 ccm eingeengt):

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 0.97 ccm  $n/100\text{-HCl}$ ;  $0.97 \times 120/100 \times 100 \times 0.14 = 16.3$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm: 0.190 ccm  $N_2$  ( $18^\circ$ , 752 mm);  $0.190 \times 100 \times 120 \times 1.137/2 \times 100 = 12.95$  mg Aminostickstoff.

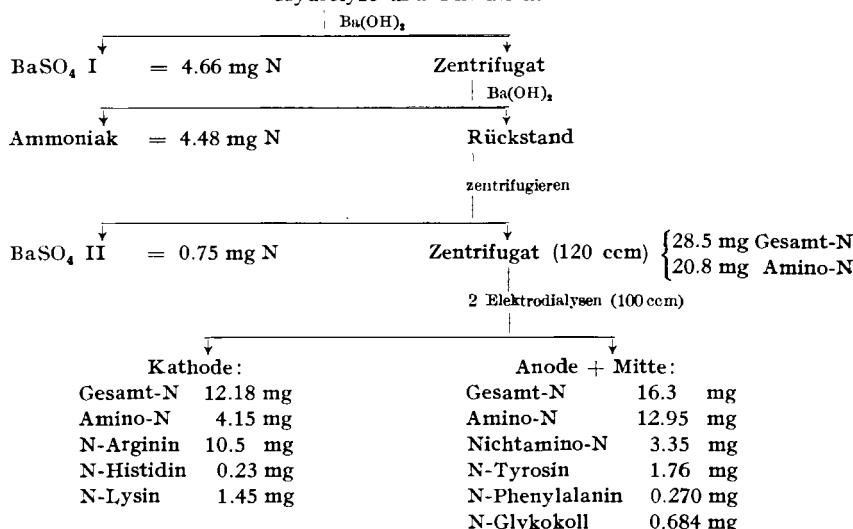
Tyrosin.  $a = 2$  ccm,  $d = 1$  cm,  $D = 58.2$ ,  $k = 0.235$  entspr. 380  $\gamma$  Tyrosin;  $380 \times 120/2 = 22.8$  mg Tyrosin (1.76 mg N).

Phenylalanin. 80 ccm wurden auf 10 ccm eingeengt und 5 ccm colorimetriert.  $a = 5$  ccm,  $d = 1$  cm,  $D = 46.7$ ,  $k = 0.331$  entspr. 1060  $\gamma$ ;  $1060 \times 2 \times 100 \times 120/80 \times 100 = 3.180$  mg Phenylalanin (270  $\gamma$  N).

Glykokoll. 10 ccm wurden mit 10 ccm Chloroform ausgeschüttelt und 5 ccm der Chloroformlösung colorimetriert.  $a = 5$  ccm,  $d = 2$  cm,  $D = 70.5$ ,  $k = 0.152$  entspr. 305  $\gamma$ ;  $305 \times 2 \times 10 \times 120/2 \times 100 = 3660$   $\gamma$  Glykokoll (0.684 mg N).

### Ferritin I.

#### Hydrolyse und Filtration.



### Hydrolyse II.

344 mg Ferritin ( $N = 10.3\%$ ,  $Fe = 21.1\%$ ) wurden wie bei der Hydrolyse I behandelt und auf Aminosäuren untersucht.

Ammoniak. 3.1 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  entspr. 4.34 mg N (Gesamtvolumen 120 ccm).

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 1.83 ccm  $n/100\text{-HCl}$ ;  $1.83 \times 0.14 \times 120 = 30.8$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm der Lösung gaben 0.315 ccm  $N_2$  ( $18^\circ$ , 752 mm);  $0.315 \times 120/2 \times 1.137 = 21.4$  mg Aminostickstoff.

Nach 2 Elektrodialysen von 100 ccm fanden wir in K<sub>II</sub> (kathodische Lösungen auf 25 ccm eingeengt):

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 2.89 ccm  $n/100\text{-HCl}$ ;  $2.89 \times 0.14 \times 25 \times 120/100 = 12.12$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm der Lösung gaben 0.265 ccm  $N_2$  ( $18^\circ$ , 752 mm);  $0.265 \times 1.137 \times 120/200 = 4.51$  mg Aminostickstoff.

Arginin. 0.1 ccm,  $d = 0.25$  cm,  $D = 43$ ,  $k = 0.367$  entspr. 125  $\gamma$  Arginin;  $0.125 \times 25 \times 10 \times 120/100 = 37.4$  mg Arginin (12.06 mg N).

Histidin. Von 25 ccm wurden 11.5 ccm auf 2 ccm eingeengt und colorimetriert;  $a = 2$  ccm,  $d = 0.5$  cm;  $D = 60.5$ ,  $k = 0.218$  entspr. 650  $\gamma$  Histidin;  $650 \times 25 \times 120/2 \times 11.5 \times 100 = 849$   $\gamma$  Histidin (230  $\gamma$  N als Histidin).

## Stickstoffverteilung nach van Slyke.

$$\begin{array}{ll}
 A + H + L = 12.12 \text{ mg} & A + L = 11.89 \text{ mg} \\
 \frac{A}{4} + \frac{H}{3} + L = 4.51 \text{ mg} & 3A + 12L = 53.20 \text{ mg} \\
 H = 0.230 \text{ mg} & L = 1.94 \text{ mg} \\
 3A + 12L = 53.20 \text{ mg} & A = 9.95 \text{ mg} \\
 3A + 3L = 35.67 \text{ mg} & \\
 \hline
 9L = 17.53 \text{ mg} &
 \end{array}$$

L (Anode und Mitte auf 100 ccm eingeengt).

Gesamtstickstoff. 1 ccm der Lösung: 0.95 ccm  $n/100$ -HCl;  $0.95 \times 120/100 \times 100 \times 0.14 = 16.0$  mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 2 ccm: 0.190 ccm  $N_2$  ( $18^{\circ}$ , 752 mm);  $0.190 \times 100 \times 120 \times 1.137/2 \times 100 = 12.95$  mg Aminostickstoff.

Tyrosin.  $a = 2$  ccm,  $d = 1$  cm,  $D = 61.7$ ,  $k = 0.210$  entspr.  $345 \gamma$  Tyrosin;  $345 \times 120/2 = 20.8$  mg Tyrosin ( $1.61$  mg N).

Phenylalanin. 80 ccm wurden auf 10 ccm eingeengt und 5 ccm colorimetriert.  $a = 5$  ccm,  $d = 1$  cm,  $D = 47.0$ ,  $k = 0.328$  entspr.  $1050 \gamma$ ;  $1050 \times 2 \times 100 \times 120/80 \times 100 = 3.150$  mg Phenylalanin ( $0.268$  mg N).

Glykokoll. 10 ccm wurden mit 10 ccm Chloroform ausgeschüttelt und 5 ccm dieser Chloroformlösung colorimetriert.  $a = 5$  ccm,  $d = 2$  cm,  $D = 69$ ,  $k = 0.161$  entspr.  $315 \gamma$ ;  $315 \times 2 \times 10 \times 120/2 \times 100 = 3780 \gamma$  Glykokoll ( $0.705$  mg N).

## Ferritin II.

## Hydrolyse und Filtration.

$$\begin{array}{c}
 \text{Ammoniak} = 4.34 \text{ mg N} \quad \downarrow \quad \text{Zentrifugat (120 ccm)} \quad \downarrow \quad \text{2 Elektrodialysen (100 ccm)} \\
 | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \\
 \text{Gesamt-N} \quad 12.12 \text{ mg} \quad \text{Gesamt-N} \quad 16.0 \text{ mg} \\
 \text{Amino-N} \quad 4.51 \text{ mg} \quad \text{Amino-N} \quad 12.95 \text{ mg} \\
 \text{N-Arginin} \quad 9.95 \text{ mg} \quad \text{Nichtamino-N} \quad 3.05 \text{ mg} \\
 \text{N-Histidin} \quad 0.25 \text{ mg} \quad \text{N-Tyrosin} \quad 1.61 \text{ mg} \\
 \text{N-Lysin} \quad 1.94 \text{ mg} \quad \text{N-Phenylalanin} \quad 0.268 \text{ mg} \\
 \text{N-Glykokoll} \quad & \quad \text{N-Glykokoll} \quad 0.705 \text{ mg}
 \end{array}$$

## Bestimmung des Tryptophans.

120 ccm Ferritin-Lösung (344 mg Trockensubstanz) wurden mit 20 ccm 20-proz. KOH 1 Stde. auf dem Wasserbad erhitzt, nach dem Erkalten von  $Fe(OH)_3$  abzentrifugiert, Niederschlag gewaschen und auf 50 ccm aufgefüllt. Da sich die Lösung als zu verdünnt erwies, wurde sie auf 10 ccm eingeengt und durch die Voisenet-Reaktion bestimmt.  $a = 2$  ccm,  $d = 0.5$  cm,  $k = 0.263$  entspr.  $635 \gamma$ .  $635 \times 10/2 = 3.175$  mg Tryptophan ( $0.435$  mg N).

Dicarbonsäurestickstoff. 0.18 g Ferritin wurden mit 20 ccm 20-proz. HCl 40 Std. gekocht und nach der von R. Kuhn und P. Desnuelle<sup>14)</sup> angegebenen Vorschrift zur Isolierung der Glutaminsäure aus Casein aufgearbeitet. Nach der zweiten Alkohol-Fällung der Dicarbon-Bariumsalze wurden diese in 25 ccm Wasser gelöst und der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. 1.00 ccm: 0.40 und 0.36 ccm  $n/100$ -HCl;  $0.14 \times 25 \times 0.4 = 1.4$  mg Dicarbonsäure-N,  $0.14 \times 25 \times 0.36 = 1.26$  mg Dicarbonsäure-N.

<sup>14)</sup> B. 70, 1920 [1937].

Aminostickstoff des nativen Ferritins I. 2 ccm: 0.03 ccm; 0.03 ccm N<sub>2</sub> (21°, 755 mm);  $0.03 \times 1.124/2 = 0.0169$  mg Aminostickstoff (5% des Gesamtstickstoffs).

Aminostickstoff des nativen Ferritins II. 2 ccm: 0.035 und 0.035 ccm N<sub>2</sub> (21°, 755 mm);  $0.035 \times 1.124/2 = 0.0197$  mg Aminostickstoff (7% des Gesamtstickstoffs).

Gesamtstickstoff des Ferritins II. 1 ccm: 2.664 mg Trockensubstanz. (Gesamtvolumen 50 ccm.) 1 ccm: 2.00 und 2.02 ccm  $n/100$ -HCl;  $2.00 \times 0.14 \times 50 = 14$  mg N,  $2.02 \times 0.14 \times 50 = 14.15$  mg N. 10.5% Gesamtstickstoff.

Hydrolyse des Ferritins II. 133.2 mg Ferritin II wurden mit 7 ccm 6-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 Stdn. unter Rückfluß gekocht, von geringen Mengen unlöslicher Flocken abzentrifugiert und diese gewaschen. Das Filtrat wurde neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und auf 50 ccm aufgefüllt.

Gesamtstickstoff des Hydrolysats. 1 ccm: 1.75 und 1.75 ccm  $n/100$ -HCl;  $1.75 \times 0.14 \times 50 = 12.28$  mg N.

Amino-N des Hydrolysats. 2 ccm: 2.40 und 2.60 ccm N<sub>2</sub> (21°, 755 mm);  $0.240 \times 50 \times 1.124/2 = 6.75$  mg Amino-N, 55% des Gesamtstickstoffs;  $0.260 \times 50 \times 1.124/2 = 7.30$  mg Amino-N, 59.5% des Gesamtstickstoffs.

### 5) Einfluß des Eisens auf die Bestimmung der Aminosäuren.

1.8 g Casein (Hammarsten, getrocknet bei 80°) wurden mit 10 ccm 6-n. Schwetelsäure und 1.21 g Ferrichlorid (wasserfrei) 40 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Bei der nach Vorschrift<sup>15)</sup> durchgeführten weiteren Verarbeitung fiel alles Eisen aus, als zum Abdestillieren des Ammoniaks mit Bariumhydroxyd alkalisch gemacht wurde. Die anschließende Trennung der Aminosäuren durch Elektrodialyse und die colorimetrische Bestimmung von Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin und Phenylalanin lieferten Werte, die mit den veröffentlichten sehr gut übereinstimmten. Dadurch war gezeigt, daß der Eisengehalt des Ferritins die Bestimmung dieser Aminosäuren nicht stört. Ganz unmöglich ist dagegen die Analyse des Cysteins im Ferritin nach dem Verfahren von R. Kuhn, L. Birkofe und F. W. Quackenbush<sup>16)</sup>, da das Eisen die jodometrische Titration stört. Wir haben daher das durch langdauernde Dialyse gegen *n*-Salzsäure gewonnene eisenfreie Protein für die Cystin-Bestimmung verwendet. Dabei stellen wir fest, daß die Methioninbestimmung des eisenfreien Proteins (gef. 2.19 und 2.20%) mit derjenigen des Ferritins (gef. 1.57%) übereinstimmt, wenn man berücksichtigt, daß das für diese Analysen angewandte Ferritin 11.0% N enthielt, während der N-Gehalt des eisenfreien Proteins 16.0% beträgt. N<sub>Protein</sub>: N<sub>Fe-Proteid</sub> = 16.0 : 11.0 = 1.45. Methionin<sub>Protein</sub>: Methionin<sub>Fe-Proteid</sub> = 2.20 : 1.57 = 1.40. Die Methioninbestimmung ist danach auch an Eisenproteiden durchführbar. Tryptophan wird bekanntlich nach alkalischer Hydrolyse bestimmt. Das Eisen des Ferritins fällt dabei nicht vollständig als Hydroxyd aus und stört. Aus diesem Grunde sind die Werte für Tryptophan in Tafel 2 in Klammern gesetzt. Es war nötig festzustellen, ob nicht die im Ferritin enthaltene Nucleinsäure bzw. die daraus bei der Hydrolyse gebildeten Purin- und Pyrimidinbasen die colorimetrische Bestimmung der Aminosäuren stören. Zu diesem Zwecke wurden 120 mg Thymonucleinsäure mit 10 ccm 6-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24 Stdn. hydrolysiert und nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt (Endvolumen 25 ccm) die Farbreaktionen auf alle für Ferritin angegebenen Aminosäuren angestellt. Diese fielen durchweg vollkommen negativ aus. Nur bei der Sakaguchi-Reaktion auf Arginin ist zu berücksichtigen, daß auch Adenin und Uracil reagieren und eine rötlich-braune (nicht lachs-orange) Färbung geben.

### 6) Analyse des Proteins; Schwefelbilanz.

Zur Abspaltung des Eisens wurde eine Lösung von kryst. Ferritin in Wasser (0.47 mg Fe/ccm und 0.23 mg N/ccm) 4 Wochen in einem Cellophanschlauch bei 5—6° gegen *n*-Salzsäure unter wiederholter Erneuerung der Außenlösung (alle 2 Tage) dialysiert.

<sup>15)</sup> B. 70, 1917 [1937].

<sup>16)</sup> B. 72, 407 [1939].

Nachdem auf diese Weise alles Eisen entfernt war (Rhodanidprobe), wurde durch Dialyse gegen dest. Wasser auch von den Chlor-Ionen befreit ( $\text{AgNO}_3$ -Probe), im Vak. verdampft und bei  $80^\circ$  (15 mm) zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.959 mg Sbst.: 5.310 mg  $\text{CO}_2$ , 1.875 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 5.298 mg Sbst.: 6.01 ccm  $n/100$ -HCl (Kjeldahl). — 33.409 mg Sbst.: 2.219 mg  $\text{BaSO}_4$  (Spiralrohrmethode nach F. Pregl-A. Friedrich<sup>17</sup>), ausgeführt von Dipl.-Ing. Jörgine Stene-Sörensen) und 0.242 mg Rückstand.

Gef. C 48.94 %, H 7.08 %, N 15.98 %, S 0.87 %.

Für aschefreies Protein berechnen sich:

C 49.29 %, H 7.14 %, N 16.10 %, S 0.88 %.

Nach R. Kuhn, L. Birkofe und F. W. Quackenbush fanden wir: 34.3, 31.2 mg Sbst.:  $5 \times 1.71$  ccm,  $5 \times 1.52$  ccm  $n/250$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 0.38 ccm, 0.38 ccm  $n/250$ -Jod; 1.15 ccm, 1.00 ccm  $n/250$ -Jod.

Daraus ergibt sich:

Gef. 0.47 % S als Methionin; gef. 0.42 % als Cystein.

Ber. 0.89 % Gesamt-Schwefel; gef. 0.87 % S als  $\text{BaSO}_4$ .

Der gesamte Schwefel wird somit durch Methionin und Cystein gedeckt. Der P-Gehalt<sup>18</sup>) des eisenfreien Proteins betrug nach Analysen von K. Schröder 0.011 %. Da das Ferritin 1.23 % P enthielt (gef. P 1.21 und 1.25 %), ergibt sich, daß praktisch alle Phosphorsäure gleichzeitig mit dem Eisen durch die Salzsäure bei der Dialyse abgespalten worden war.

Die Methioninbestimmung des Ferritins selbst ergab: 35.8 mg Sbst.:  $5 \times 1.13$  ccm  $n/250$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

### 7) Prüfung auf katalytische Wirkungen.

#### 1) Keine Katalase-Wirkung.

10 ccm des benutzten  $\text{H}_2\text{O}_2$  verbrauchten 2.9 ccm  $n\text{-KMnO}_4$ . Nach Zugabe von je 1, 2, 3 und 4 ccm Ferritin-Lösung (1 ccm = 11.16 mg Ferritin) trat bei  $20^\circ$  und  $\text{pH } 7$  ( $m/15$ -Phosphatpuffer) innerhalb von 15 Min. keine Änderung des Titrationswertes auf.

#### 2) Keine Peroxydase-Wirkung.

Bei der Untersuchung auf Peroxydase-Wirkung nach der Methode von R. Willstätter und A. Polninger<sup>19</sup>) (0.5 g Pyrogallol, 4.85 mg  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 33.489 mg Ferritin, Gesamtvol. 250 ccm,  $t = 21^\circ$ ) trat keine Purpurogallinbildung auf. Ein mit Äther ausschüttelbarer Farbstoff zeigte sich erst nach dem zur Unterbrechung der Peroxydasewirkung üblichen Zusatz von 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; offenbar wirkte nur das durch die Schwefelsäure aus dem Ferritin abgespaltene Ferrisalz peroxydatisch.

#### 3) Keine Tyrosinase-Wirkung.

Zum Vergleich wurde die Reaktion mit einer aus Kartoffelschalen<sup>20</sup>) dargestellten Tyrosinase-Lösung durchgeführt. Verwendet man Ferritin (111.6 mg), so zeigt sich keinerlei Tyrosinase-Wirkung.  $t = 38^\circ$ . Reaktionsdauer 12 Stdn. Versuchsanordnung: 10 ccm Tyrosinase- bzw. Ferritin-Lösung, 10 ccm Tyrosin und 30 ccm Wasser.

#### 4) Keine Aldehyddehydrase-Wirkung<sup>21</sup>).

55.8 mg Ferritin wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit 1 ccm 40-proz. Formalin-Lösung und 2 Tropfen  $1/1000$  molarer Methylenblau-Lösung versetzt. Die grünbraune

<sup>17</sup>) A. Friedrich u. O. Watzlawek, Ztschr. analyt. Chem. **89**, 401 [1932].

<sup>18</sup>) Bestimmt nach K. Lohmann u. L. Jendrassik, Biochem. Ztschr. **178**, 419 [1926].

<sup>19</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **130**, 281 [1923].

<sup>20</sup>) P. Rona, Praktikum der physiol. Chemie, 1. Teil, Fermentmethoden, 2. Aufl. Verlag Springer, Berlin 1931, S. 372.

<sup>21</sup>) L. Gattermann u. H. Wieland, Die Praxis des organischen Chemikers 24. Aufl. 1936, S. 220.

Lösung wurde 18 Stdn. im Thermostaten bei 38° geschüttelt. Es trat keine Entfärbung ein. Auch mit *n*-Butyraldehyd an Stelle des Formaldehyds war keine Methylenblau-Entfärbung zu beobachten.

5) Keine Aldehydmutase-Wirkung.

Nach J. Parnas<sup>22)</sup> wurden 1 ccm Salicylaldehyd bzw. *n*-Butyraldehyd bzw. *n*-Heptylaldehyd mit 55.8 mg Ferritin und 1 g NaHCO<sub>3</sub> in 100 ccm Wasser bei 38° bis zu 24 Stdn. unter CO<sub>2</sub> geschüttelt. In jedem Falle verbrauchte die gebildete, mit Wasserdampf flüchtige Säure nur 1—2 ccm *n*-NaOH, während bei vollständiger Disproportionierung der eingesetzten Aldehyde 8—10 ccm *n*-NaOH erforderlich gewesen wären. Im Kontrollversuch mit Schweineleberbrei wurden aus 1 g *n*-Butyraldehyd 83.5% d. Th. an *n*-Buttersäure (6.4 ccm *n*-NaOH) erhalten.

Dem „Statens videnskapelige Forskningsfond av 1919“ und dem „Nationalgaven til Chr. Michelsen“, Bergen, haben wir für die Gewährung von Stipendien, Frau Dipl.-Ing. Jörgine Stene und Fr. Ruth Haas für eifrige Mithilfe bei Ausführung der Versuche zu danken.

<sup>22)</sup> Biochem. Ztschr. 28, 274 [1910].

---

Berichtigungen.

Jahrg. 73 [1940], Heft 6, S. 608, Zeile 9—10 v. o. lies „daß in einem Laboratorium, in welchem ...“ statt „daß in den ... Laboratorien, in welchen“. Ebenda, S. 648, 2. Zeile v. u. lies „zu Guajacol“ statt „zum Brenzcatechin“. Ebenda, S. 689, 9. Zeile v. u. lies „Phenylhydrazin“ statt „Phenylhydrazon“. Ebenda, S. 696, 8. Zeile v. u. lies „7-Benzoyloxy-8-benzoyl-acenaphthylen“ statt „7-Benzoyloxy-8-benzoyl-acenaphthylenbenzoat“.

---