

## JODID-BESTIMMUNG IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

HATANORI OGATA UND YASUSHI HAYASHI

*Institut der Protein-Chemie, Medizinische  
Yamaguchi Fakultät, Ube*

(Eingegangen am 10. Juni 1953)

Bei der sukzessiven Extraktion der Gewebseiweisse (1, 2) wurde es nötig, das Volumen der unlöslichen Substanz zu ermitteln. Dieses nun lässt sich berechnen, wenn einer bestimmten Menge Gewebsbrei eine bekannte Menge geeigneter Substanz zugesetzt und ihre Konzentration in der Flüssigkeit bestimmt wird. Doch ist bei diesen zuzusetzenden Substanzen zu beachten:

1. dass sie keine Reaktion mit den Gewebebestandteilen eingehen und
2. in möglichst kleiner Menge benutzt werden, so dass ihre Mikrobestimmung möglich ist,
3. dass das Bestimmungsverfahren einfach ist, und
4. dass bei benötigter Enteiweissung die Bestimmung durch letztere nicht gestört wird. Am zweckmässigsten ist es, die Verbindungen der Radioisotope zu benutzen. Hier aber wurden die Versuche mit Xylose, p-Nitrophenol und Kaliumjodid ausgeführt, von welchen Xylose und p-Nitrophenol keinen guten Ausfall ergaben (2). Nur das Jodid fiel gut aus, weil es auf Eiweiss nicht reagiert, während das Jod auf dieses reagiert. So kommt es also auf die Bestimmung des Jodids in den biologischen Flüssigkeiten an.

### *Bestimmung des Jodids in einfacher wässriger Lösung*

Die Bestimmung des Jods in den biologischen Flüssigkeiten ist mehrfach (3-9) versucht worden. Da sie gewöhnlich auf das gebundene in sehr geringer Menge vorhandene Jod abgezweckt war, so wurde dieses nach dem Digerieren des Materials abdestilliert. Hier aber handelt es sich um das in mässiger Menge zugesetzte Jodid, im Vergleich mit welchem das im Gewebe vorhandene gebundene Jod vernachlässigt werden kann. Man braucht hier demnach nur das Jodid in den enteieissten Flüssigkeiten zu bestimmen.

Wenn die zu untersuchende Lösung nur Mineralien und zwar nur Jodid als Halogenid enthält, ist die Silberjodid-Methode in Anwendung zu bringen. Weil es sich aber schliesslich um die biologischen Flüssigkeiten mit Chlorid handelt, ist es nur nötig, das Jodid auswählend zu bestimmen. Und weil in diesem Fall das Jodid zu Jod oxydiert und das Jod reduktometrisch leicht bestimmbar ist, kommt es auf die Oxydation des Jodids zu Jod und die Beseitigung der Oxydationsmittel an.

Extraktion des Jods mit Chloroform — Wenn das Jodid zum Jod oxydiert wird, muss der Oxydationsmittelüberschuss vor der Titration des Jods mit Thiosulfat beseitigt werden. Zunächst benutzten wir das Wasserstoffsperoxyd als Oxydationsmittel. Wie Tab. I zeigt, fiel der Versuch, den Überschuss an  $H_2O_2$  durch katalytische Spaltung mit Silber zu beseitigen, unzureichend aus. Ebenfalls wäre es unmöglich, den Überschuss quantitativ mit Permanganat zu oxydieren. Croak (9) benutzt Permanganat, um Jodid zu oxydieren, und reduziert den

TABELLE I

*Katalytische Beseitigung des Wasserstoffsperoxyds*

20 ml 0.5 M  $H_2O_2$  wurde mit 20 ml Wasser versetzt, 5 cm<sup>2</sup> zerkleinertes Silberblech hinzugefügt, und die Lösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einer bestimmten Zeit wurde davon 2 ml mit N/20 Permanganatlösung titriert.

Zeit der Einwirkung in Minuten	10	20	30	60	120
Spaltung, %	24	37	50	69	87

Überschuss an Permanganat mit Nitrit und den Überschuss an Nitrit mit Harnstoff. McCullaugh (10) oxydiert Jodid mit Brom und verdunstet das überschüssige Brom. Da wir mit dem enteiwisssten, verschiedene Stoffe enthaltenden Gewbsextrakt umzugehen haben, kann der Zusatz von Nitrit und Harnstoff bei ersterem und das Verdunsten bei letzterem Verfahren Fehler verursachen. Folglich wurde das Jod mit Chloroform extrahiert und nach dem Fortgiessen der wässrigen Schicht mit Wasser gewaschen und titriert. Tab. 2 zeigt, dass das angeführte Verfahren völlig quantitativ vor sich geht, welches daraus erkennbar

TABELLE II

*Bestimmung des Jodids in eiweisshaltigen Flüssigkeiten*

1 ml KJ-Lösung mit Eiereiweiss von angeführter Konzentration oder ohne Eiweiss wurde in einem 10 ml Messkolben mit 2 ml 10% iger  $ZnSO_4$ -Lösung und 2% iger NaOH-Lösung versetzt, 5–10 Minuten im Wasserbad erwärmt, nach dem Erkalten bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und filtriert. Zu 1 ml Filtrat wurde 2 ml Chloroform, 1 ml  $H_2SO_4$  und 2 ml Permanganat hinzugefügt und geschüttelt. Nach dem Waschen wurde die Chloroformschicht mit Thiosulfat titriert.

Konzentration des Eiweisses	4	8	16	0
Thiosulfat, ml N/200	0.830	0.840	0.812	0.842

wird, dass bei 25° die Verteilungskonstante 126-135 ist. Es sei hier erwähnt, dass, während das Permanganat sehr verdünnt angewandt werden kann, das Wasserstoffsperoxyd in weit stärkerer Konzentrierung benutzt werden muss, so dass seine Verwendung wegen des mehrmaligen Waschens von Nachteil ist.

*Bestimmung des Jodids in biologischen Flüssigkeiten*

Wird die Jodid-haltige Eiweisslösung nach dem modifizierten Hagedorn-

schen Verfahren (10) enteiweisst und dem Filtrat zur Extraktion des Jods Chloroform hinzugefügt, so pfllegt das Chloroform gellartig zu werden, und die Resultate fallen, wie Tab. 3 zeigt, oft ungenügend aus. Folglich wurde die Lösung nach Somogyi (11), mit konzentrierten Reagentien und weiter modifiziert, unter Erwärmung im Wasserbade enteiweisst. Tab. 4 zeigt, dass das angeführte Verfahren zufriedenstellend ist.

TABELLE III

*Einfluss der Hagedorn'schen Enteiweissung auf die Jodbestimmung*

A. 0.1 ml KJ-Lösung mit Eiweiss von angeführter Konzentration oder ohne Eiweiss, wurde nach Hagedornscher Methode enteiweisst. 1 ml Filtrat wurde mit 2 ml Chloroform, 1 ml 15 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 2 ml Permanganat versetzt. Nach dem Waschen der Chloroformschicht wurde mit Thiosulfat titriert.

Konzentration des Eiweisses, %	5	10	0
Thiosulfat, ml N/200	1.405	1.321	1.462

B. Zum angeführten Volumen Blut oder Wasser wurde KJ-Lösung hinzugefügt, davon 0.1 ml nach Hagedorn enteiweisst und wie oben titriert.

Blut, ml	20	22	24	26	Wasser, ml	20
KJ-Lösung, ml	10	8	6	4		10
Thiosulfat, ml N/200	0.701	0.556	0.408	0.272		0.688

TABELLE IV

*Quantitative Extraktion des Jods mit Chloroform*

A. 1-3 ml 0.0018 NKJ-Lösung wurde mit 2 ml Chloroform, 1 ml 15 N Schwefelsäure und 0.75-2.0 ml ca. N/250 Permanganat-Lösung versetzt, geschüttelt und einige Minuten stehen gelassen. Die wässrige Schicht wurde abgesaugt. Nach dreimaligem Waschen der Chloroformschicht mit je 2 ml Wasser wurde sie mit N/200 Thiosulfat titriert.

KJ-Lösung, ml	1	1	1	2	2	2	3	3	3
Permanganat, ml	0.75	1.0	1.25	1.25	1.5	1.75	1.5	1.75	2.0
Thiosulfat, ml	0.280	0.280	0.280	0.551	0.560	0.566	0.815	0.833	0.833
Durchschnitt	0.280			0.559 (0.279)			0.827 (0.276)		

B. Als Oxydationsmittel wurde statt Permanganat 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebraucht. Sonstige Bedingungen wie oben.

KJ-Lösung, ml	1	1	1	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration, %	10	1	0.1	0.01
Thiosulfat, ml	0.280	0.280	0	0

Das zuletzt aufgenommene Verfahren ist wie folgt.

Erforderliche Lösungen:

1. 10% ige  $\text{ZnSO}_4$ -Lösungen,
2. 2% ige  $\text{NaOH}$ -Lösungen,
3. Chloroform,
4. 15 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösungen,
5. ca. N/250  $\text{KMnO}_4$ -Lösung,
6. N/200 Thiosulfatlösung,
7. Stärkelösung.

*Ausführung*; Man beschickt einen 10 ml Messkolben mit 1 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit, mit 2 ml  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung sowie 2 ml  $\text{NaOH}$ -Lösung und

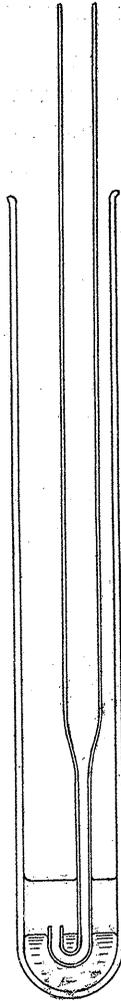


Abb. 1. Zur Bestimmung des Jodes.

erwärmt 5-10 Minuten im Wasserbad. Nach dem Erkalten fügt man Wasser bis zur Marke hinzu und filtriert. Man beschickt ein Reagenzrohr (21 mm Durchmesser) mit 1 ml Filtrat, 2 ml Chloroform, 1 ml Schwefelsäure und 2 ml Permanganatlösung. Das Röhrchen schüttelt man einige Minuten und lässt es stehen, bis das Chloroform (meist violett gefärbt) sich von der wässrigen Schicht abtrennt. Nun wird letztere mit einem nach oben gebogenen Glasröhrchen (s. Abb. 1.) sorgfältig abgesaugt. Man fügt neu 2 ml Wasser hinzu und schüttelt, um nach dem Absinken des Chloroforms die wässrige Schicht wieder sorgfältig abzusaugen. Dieses Waschen wird noch zweimal wiederholt. Dann wird die Chloroformschicht mit Thiosulfat titriert.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das den biologischen Flüssigkeiten zugesetzte Jodid wurde titrimetrisch bestimmt. Zur Beseitigung der Eiweisse wurde ein modifiziertes Somogyisches Verfahren benutzt. Das Jodid wurde mit Permanganat zu Jod oxydiert, dieses mit Chloroform extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit Thiosulfat titriert.

*Herrn Prof. Dr. S. Nakamura sprechen wir hier unsern besten Dank aus für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit.*

#### L I T E R A T U R

- 1) NAKAMURA, S., HAYASHI, Y. UND TANAKA, K.: *J. Biochem.* (Japan), **41**, 13, 1954.
- 2) HAYASHI, Y.: *Bull. Yamaguchi Med. School.* **1**, 141, 1953.
- 3) PFEIFFER, G.: *Biochem. Z.*, **195**, 123, 1928.
- 4) LEIPERT, T.: *Ibid*, **261**, 437, 1933; **270**, 448, 1934.
- 5) TREVORROW, V. UND FASCHENA, G. J.: *J. Biol. Chem.* **110**, 31, 1935.
- 6) FASCHENA, G. J. UND TREVORROW, V.: *Ibid*, **114**, 351, 1936.
- 7) MATHEWS, N. L., CURTIS, G. M. UND BRODE, W. R.: *Ind. Eng. Chem.*, Anal. Ed., **10**, 612, 1938.
- 8) CROAK, B.: *Biochem. Z.*, **270**, 291, 1934.
- 9) McCULLAUGH, E.: *J. Biol. Chem.*, **116**, 21, 1936.
- 10) HAGEDORN, H. C. UND JESSEN, H.: *Biochem. Z.*, **135**, 46, 1923; **137**, 92, 1923.
- 11) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **86**, 655, 1930; **70**, 599, 1926.