

Fluor-anilin wurde dagegen nicht erhalten, als der weiße Niederschlag aus der Umsetzung des *N*-Chlor-amids mit Bariumhydroxyd am Rückfluß mit Wasser gekocht wurde. Auch durch Erwärmen von 1 g *N*-Chlor-amid mit 10 ccm 7-proz. Natronlauge<sup>19)</sup> schieden sich zwar Öltröpfchen ab, aber nach Aufnehmen in Äther wurde als Destillationsrückstand nur eine ölig-feste Masse erhalten; *N*-Chlor-benz-amid<sup>20)</sup> lieferte dagegen bei gleicher Behandlung ohne weiteres Anilin. Schließlich wurde auch durch Schütteln einer Lösung von *N*-Chlor-*o*-fluor-benzamid in Chloroform mit Natronlauge kein *o*-Fluor-anilin gewonnen.

Hr. Prof. Skita stellte auch für diese Untersuchung die Mittel seines Instituts bereitwilligst zur Verfügung, wofür wir ihm unseren besten Dank sagen.

## 246. Alfons Schöberl und Ernst Ludwig: Die Aufspaltung der Disulfidbindung mit Natriumsulfit und Kaliumcyanid und über die colorimetrische Bestimmung von Sulfhydryl-Verbindungen und Disulfiden.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Würzburg.]

(Eingegangen am 24. Mai 1937.)

Die Entdeckung der Aktivierbarkeit hydrolysierender Fermente durch Sulfhydryl (SH)-Verbindungen, Schwefelwasserstoff, schweflige Säure und Blausäure bedeutet ohne Zweifel für unsere Kenntnisse über die Wirkungsweise und Struktur dieser immer noch so rätselhaften Biokatalysatoren einen wichtigen Fortschritt<sup>1)</sup>. Es führte dies letzten Endes zu der besonders von Th. Bersin<sup>2)</sup> vertretenen, heute viel diskutierten Annahme von der Thiolnatur von Papain, Kathepsin und Urease<sup>3)</sup>, die freilich bei dem heutigen Stand der Reindarstellung dieser Fermente noch nicht als völlig erwiesen angesehen werden kann. Bei den angedeuteten Aktivierungen, die zumeist von dem Auftreten neuer aktiver SH-Gruppen begleitet sind, steht die reduktive Aufspaltung von SS-Bindungen im Fermentmolekül selbst oder in Begleitstoffen (z. B. SS-Glutathion oder cystinhaltige Peptide) im Vordergrund. Auch hier hat der Modellversuch an einfachen Vertretern der großen Stoffklasse der Disulfide die experimentelle Grundlage für eine in ihrer Deutung und Auswertung wichtige Reaktionsweise abzugeben. In letzter Zeit ist in diesem Zusammenhang besonders das Verhalten von Disulfiden gegenüber schwefliger Säure und Blausäure wichtig geworden.

Man kann die Einwirkung dieser Säuren bzw. deren Salze auf gewisse Disulfide nicht als eigentliche Reduktion bezeichnen, da in beiden Fällen nur 50% SH-Verbindung maximal entstehen können. Es liegt vielmehr eine Disproportionierung der SS-Bindung vor, die analog der Ein-

<sup>19)</sup> C. Graebe u. L. Rostovzeff, B. **35**, 2751 [1902].

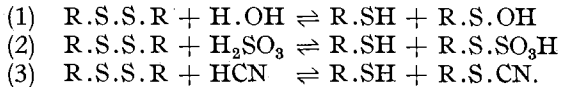
<sup>20)</sup> Dargestellt nach R. L. Datta u. T. Gosh, Journ. Amer. chem. Soc. **35**, 1044 [1913] (C. **1913** II, 1301).

<sup>1)</sup> vergl. W. Graßmann u. F. Schneider, Ergebn. d. Enzymforsch., Bd. V, S. 79 [1936].

<sup>2)</sup> Ergebn. d. Enzymforsch., Bd. IV, S. 68 [1935].

<sup>3)</sup> Th. Bersin, Biochem. Ztschr. **278**, 340 [1935]; L. Hellermann u. M. E. Perkins, Journ. biol. Chem. **107**, 241 [1934]; A. Purr, Biochem. Journ. **29**, 13 [1935]; E. Maschmann, Biochem. Ztschr. **280**, 204 [1935]; J. B. Sumner u. L. O. Poland, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **30**, 553 [1933].

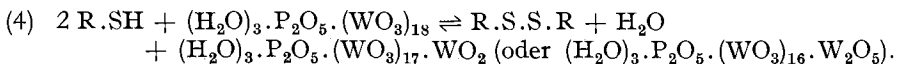
wirkung von Wasser (Gleich. 1) aufzufassen ist. Bei bestimmten Wasserstoffionenkonzentrationen entsteht mit Sulfit neben der SH-Verbindung ein Thioschwefelsäure-ester (Gleich. 2) und Kaliumcyanid liefert daneben noch ein Rhodanid (Gleich. 3):



Die Analogie mit der hydrolytischen Aufspaltung ist aber insofern einzuschränken, als diese viel heftigeren Bedingungen bedarf. Hingegen können Sulfit und Cyanid in geeigneten Fällen schon bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich glatt reagieren. Vor allem hat man Cystin und cystinhaltige Stoffe in diesem Zusammenhang recht häufig untersucht, bilden doch die Gleichungen 2 und 3 die Grundlage zweier in der Biochemie viel benutzter Bestimmungsmethoden für Cystin und SS-Glutathion. Die Einwirkung von Sulfit auf Cystin geht auf Beobachtungen von A. Heffter<sup>4)</sup> zurück und ist von H. T. Clarke<sup>5)</sup> eingehend untersucht worden. Die Umsetzung mit Cyanid hat bereits J. Mauthner<sup>6)</sup> richtig erkannt. Die Entstehung des Rhodanides,  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -rhodan-propionsäure, ist hier gesichert<sup>7)</sup>. Daß auch bei SS-Glutathion das KCN nicht nach der Gleichung:  $\text{R.S.S.R} + \text{KCN} + \text{H}_2\text{O} = 2 \text{R.SH} + \text{KCNO}$  wirkt, wie vor allem J. Kühnau<sup>8)</sup> wiederum behauptete, wurde schon von W. Graßmann und E. Hanschke<sup>9)</sup> erwiesen.

Es ist das Verdienst von O. Folin und seiner Schule, in einer Reihe von Untersuchungen die Brauchbarkeit von 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure (im nachfolgenden als Folin-Reagens bezeichnet) zur colorimetrischen Bestimmung von Cystein und Cystin gezeigt zu haben<sup>10)</sup>. Die oft benutzte Methode hat in letzter Zeit mancherlei Abänderung erfahren. Aber weder die Vorschläge von C. Rimington<sup>11)</sup> noch die von S. L. Tompsett<sup>12)</sup> konnten voll befriedigen, wovon auch wir uns überzeugten. Erst in den Arbeiten von J. W. H. Lugg<sup>13)</sup> und K. Shinohara<sup>14)</sup> begannen sich die exakten Grundlagen der Folin-Methode herauszuschälen.

An insgesamt 8 Beispielen benutzten wir mit gutem Erfolg das Folin-Reagens zur quantitativen Bestimmung von Thiol-carbonsäuren. Diese reduzieren die Heteropolysäure zu einer intensiv blauen noch komplexen Säure vermutlich nach Gleich. 4<sup>15)</sup>:



Die Phosphorwolframsäure als starkes Oxydationsmittel verschiebt das Gleichgewicht dieser Reaktion praktisch ganz auf die rechte

<sup>4)</sup> C. 1907 II, 822.

<sup>5)</sup> Journ. biol. Chem. **97**, 235 [1932].

<sup>6)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **78**, 28 [1912]; vergl. Pulewka u. Winzer, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **138**, 154 [1928].

<sup>7)</sup> vergl. auch die von Bersin<sup>2)</sup> erwähnte Aufspaltung von Dithio-diglykolsäure-anilid. <sup>8)</sup> Biochem. Ztschr. **230**, 353 [1931].

<sup>9)</sup> Dissertat. München 1932.

<sup>10)</sup> vergl. O. Folin u. A. D. Marenzi, Journ. biol. Chem. **83**, 103 [1929].

<sup>11)</sup> Biochem. Journ. **24**, 1114 [1930].

<sup>12)</sup> Biochem. Journ. **25**, 2014 [1931].

<sup>13)</sup> Biochem. Journ. **26**, 2160 [1932].

<sup>14)</sup> Journ. biol. Chem. **112**, 709 [1936].

<sup>15)</sup> vergl. H. Wu, Journ. biol. Chem. **43**, 189 [1920].

Seite. Rasche Oxydation und Konstanz der entstehenden Farbintensität sind am besten bei einem  $p_H$  um 5 gewährleistet. Jedoch muß bei der praktischen Durchführung in einem Acetatpuffer die Einstellung des Farbmaximums abgewartet werden. Die Methode zeichnet sich dann durch Einfachheit und Empfindlichkeit aus. Wie zu erwarten war, gaben von den 8 SH-Verbindungen 7 mit Folin-Reagens etwa die gleiche Farbstärke. Für  $2 \times 10^{-4} m$ . Lösungen bestimmte man mit dem Pulfrich-Photometer und dem Rotfilter S 72 Extinktionskoeffizienten um 0.8 (Tab. 1). Ob den kleinen Schwankungen um den Wert 0.8 eine tiefere Bedeutung zukommt, mag dahingestellt sein. Es waren  $\alpha$ -Sulphydryl-carbonsäuren, die sich wie Cystein ermitteln ließen. Die glatte Bestimmbarkeit von  $\alpha$ -Sulphydryl-zimtsäure(VII) sei besonders erwähnt. Nur ein einziges Beispiel, eine  $\beta$ -Sulphydryl-carbonsäure, fällt aus der Reihe. Thiohydracrylsäure (VIII) kann das Folin-Reagens nicht so weit reduzieren. Dies ist deshalb merkwürdig, weil ja auch im Cystein(I) eine  $\beta$ -ständige SH-Gruppe vorhanden ist. Bestimmt man aber Thiohydracrylsäure in Bicarbonat-Lösung, so tritt auch hier die gleiche Reduktionsfähigkeit wie bei den anderen SH-Verbindungen auf (I, 3). Dieses Substrat scheint also ein schwächeres Reduktionsmittel zu sein.

Die Bestimmung von SH-Verbindungen mit Folin-Reagens bei Anwesenheit von Sulfit ergibt in manchen Fällen eine beträchtliche Erhöhung der Farbtiefe. So wird bei einer allerdings ziemlich hohen Sulfitkonzentration die mit Cystein erzielbare Farbintensität gerade verdoppelt (I, 2). Der Grund hierfür ist in den beiden Gleichungen 2 und 4 zu suchen, die als Folgereaktionen ineinander greifen. Primär wird nach Gleich. 4 Cystein durch die Heteropolysäure zu Cystin oxydiert. Dieses Disulfid selbst aber unterliegt nun nach Gleich. 2 der Einwirkung von Sulfit, was ja wiederum zu Cystein führt. Das so nun sekundär entstandene Cystein verfällt alsbald der Oxydation nach Gleich. 4 und die Reaktionsfolge kann erneut beginnen. Dies wird sich so lange wiederholen, bis das gesamte Cystein in das Thioschwefelsäure-Derivat übergeführt ist. Voraussetzung dieser Methode ist, daß Oxydation der SH-Verbindung und Disproportionierung des Disulfides sich mit hinreichender Geschwindigkeit vollziehen. Die 2. Reaktion, die bei manchen Disulfid-carbonsäuren recht träge verlaufen kann, ist geschwindigkeitsbestimmend. Auch beim Cystein kann aus diesem Grund die colorimetrische Messung erst nach einer gewissen Reaktionsdauer vorgenommen werden. Im übrigen liefern die Bestimmungen mit Sulfit, die noch sehr kleine Cysteinkonzentrationen zu vermessen gestatten, ebenso genaue Ergebnisse wie die ohne Sulfit. Mit  $\alpha$ -Sulphydryl-zimtsäure (VII) und mit Thiohydracrylsäure (VIII) erzielte man durch Sulfitzusatz keine völlige Verdoppelung der Farbintensität. Das gleiche stellte Shinohara auch für Thioglykolsäure fest. Man könnte schon hieraus folgern, daß sich die entsprechenden Disulfide nicht glatt nach Gleich. 2 mit Sulfit umsetzen (vergl. später). Die Bestimmung anderer SH-Verbindungen, wie Dimethyl- und Diphenyl-thioglykolsäure, mit Folin-Reagens wird durch Sulfit überhaupt nicht beeinflusst.

Die glatte Aufspaltung der SS-Bindung im Cystin durch Sulfit bildet die Grundlage einer einfachen Bestimmungsmethode für diese wichtige Aminosäure mittels des Pulfrich-Photometers<sup>16)</sup>. Man muß dabei ein

<sup>16)</sup> vergl. B. Kassel, Journ. biol. Chem. 109, XLIX [1935].

bestimmtes  $p_H$  (um 5) einhalten und vor allem einen sehr großen Überschuß von Sulfit, der etwa 300-fachen Menge, verwenden. Selbst bei diesem großen Sulfit-Überschuß benötigt aber die Umsetzung nach Gleich. 2 eine gewisse Zeit. Die Nichtbeachtung dieser Versuchsbedingungen kann völlig fehlerhafte Ergebnisse verursachen. Ein Mol. Cystin erzielt dann die gleiche Farbintensität wie ein Mol. Cystein mit Sulfit (III, 1). Zur Ermittlung der für die Messungen geeigneten Wellenlänge sind die Absorptionskurven für 2 verschiedene Cystinkonzentrationen aufgenommen worden (Fig. 3). Sie zeigen keinen charakteristischen Verlauf. Die Absorption der blauen Verbindung aus der Phosphorwolframsäure nimmt ziemlich gleichmäßig mit der Zunahme der Wellenlänge zu. Das Rotfilter S 72 mit dem Filterschwerpunkt bei  $729 m\mu$  ist für die Colorimetrie am günstigsten. Für manche Beobachter mag das Gelbfilter S 57, mit dem wir ebenfalls gemessen haben, geeigneter sein.

Wie aus den beiden mit diesen Filtern ermittelten Eichkurven hervorgeht (Fig. 1), ist das Beersche Gesetz in dem Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$ - bis  $4 \times 10^{-4}$ -molar gültig. Aus den Eichkurven kann ohne weiteres für einen gefundenen Extinktionskoeffizienten ( $E_k$ ) eine unbekannte Cystinkonzentration abgelesen werden (III, 2).

Die glatte Umsetzung von Sulfit mit Cystin und die sich anschließenden Folgereaktionen ergeben sogar die Möglichkeit, Cystin und Cystein nebeneinander zu bestimmen. Das ist für gewisse Probleme und wegen der Empfindlichkeit der SH-Gruppe gegen Luft- $O_2$  nicht ganz ohne Bedeutung. Man hat dazu nur 2 Bestimmungen mit und ohne Sulfit durchzuführen.

Als nun versucht wurde, die Erfahrungen bei der Colorimetrie von Cystin auch für andere Disulfide heranzuziehen, traten bemerkenswerte Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Substrate auf. Von 10 untersuchten Disulfiden war nämlich kein einziges mit Folin-Reagens ebenso glatt wie Cystin bestimmbar. Einige Vertreter reduzierten mit Sulfit die Heteropolysäure sogar überhaupt nicht. Die genau wie bei Cystin zusammengesetzten Reaktionsansätze, in denen Substrat, Sulfit und Folin-Reagens miteinander reagierten, konnten so Aufschluß über die Geschwindigkeit der Aufspaltung der S-S-Bindung durch Sulfit geben. Die entstehende SH-Verbindung (Gleich. 2) zeigt sich durch Farbvertiefung an, so daß aus dem Extinktionskoeffizienten auf die Höhe dieser Disulfidspaltung geschlossen werden konnte. Zunächst sind die Versuche bei einem etwa 100-fachen Überschuß von Sulfit durchgeführt worden (IV, 1a). Diese zu geringe Konzentration läßt sogar beim Cystin die Geschwindigkeit der Sulfit-Einwirkung klar hervortreten. Cystamin, Diformyl-cystin, Dithio-diglykol- und Dithio-dihydracrylsäure werden viel langsamer wie Cystin reduziert. Dithio-dilactyl-, Disulfid-bernsteinsäure, Diphenyl-, Tetramethyl- und Tetraphenyl-dithiodiglykolsäure werden auch nach 14 Std. überhaupt nicht angegriffen (Tab. 6, A). Besonders merkwürdig ist, daß Sulfit auch Diformyl-cystin, ein einfaches Derivat des Cystins, so langsam auf-

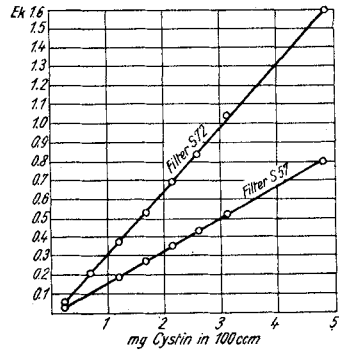


Fig. 1. Eichkurven für die Bestimmung von Cystin mit 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure.

spaltet. Verhältnismäßig rasch wird noch Cystamin reduziert. Dithio-diglykol- und Dithio-dihydracrylsäure greift Sulfid etwa gleich langsam an. Die Stellung der SH-Gruppe scheint daher nicht von großer Bedeutung zu sein. Nur ein einziges Disulfid, nämlich Distyryl-disulfid-dicarbonensäure, wird sogar noch etwas schneller als Cystin aufgespalten. Das ist besonders auffällig. Eine Übersicht über die reduzierbaren Disulfide vermittelt Fig. 2; die Ex-

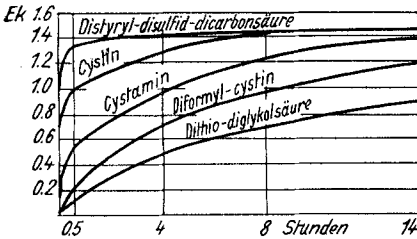


Fig. 2. Geschwindigkeit der Aufspaltung von Disulfiden mit Sulfid, ermittelt mit 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure.

tinktionskoeffizienten geben Auskunft über das Fortschreiten der Sulfid-Einwirkung.

Die Verknüpfung der SS-Gruppe mit sekundären und tertiären C-Atomen scheint die Ursache für die Nichtreduzierbarkeit zu sein. Erhöht man die Sulfitkonzentration auf einen etwas mehr als 200-fachen Überschuß, so tritt auch hier noch das verschiedene Verhalten der Disulfide klar zutage (IV, 1b). Nur Cystin ist nach 30 Min. bereits völlig durchreduziert, während

Cystamin und Diformyl-cystin nach 4 Stdn. ebenfalls den Höchstwert der Extinktion ergaben. Bei Dithio-diglykol- und Dithio-dihydracrylsäure war die Sulfitspaltung auch nach 8 Stdn. noch nicht zu Ende.

Graßmann und Hanschke<sup>9)</sup> haben bei der viel benutzten colorimetrischen Bestimmung von SH-Verbindungen mit Nitroprussidnatrium auf die Wichtigkeit des geeigneten  $p_H$  aufmerksam gemacht und mit einem Glykokoll-Puffer gearbeitet. Bei der Auswertung der roten Farbreaktion mit dem Pulfrich-Photometer zeigten sich eine Reihe von Fehlermöglichkeiten, die genaue Ergebnisse oft in Frage stellen. Jedoch kann auch diese Methode bei Einhaltung gewisser Bedingungen verwertbare Ergebnisse liefern. Die wichtigste Fehlerquelle ist die Instabilität der roten Farbe. Alle Messungen, die wir stets in Glykokoll-Puffer-Lösung von  $p_H$  10.4<sup>17)</sup> ansetzten, sind daher sehr rasch durchzuführen. KCN stabilisiert die Farbreaktion außerordentlich. Ohne KCN lassen sich kaum richtige Ergebnisse erzielen (II, 2). Natürlich ist das Cyanid an der Bildung des Farbkomplexes nicht beteiligt, sondern hemmt nur die Oxydation der SH-Verbindung durch  $O_2$ . Für die Erzielung des Maximums der Farbintensität ist auch eine hinreichende Nitroprussidnatrium-Konzentration wichtig.

Es ist durchaus verständlich, daß die Intensität der Nitroprussidnatrium-Reaktion mit den verschiedenen Substraten nicht gleich ist. Es kommen sehr große Unterschiede vor<sup>18)</sup>. Sehr empfindlich ist die Farbreaktion mit Thioglykolsäure (II) ( $E_k$  [stets für  $2 \times 10^{-4}$ -m. Lösungen und Filter S 53] = 1.04) und mit Thio-hydracrylsäure (VIII) ( $E_k$  = 0.86), während mit Thioäpfelsäure (VI), Dimethyl-(III) und Diphenyl-thioglykolsäure (IV) nur mehr schon recht schwache Färbungen erzielt werden ( $E_k$  = 0.24, 0.20 und

<sup>17)</sup> Dieser Puffer läßt sich durch den  $NH_3-NH_4Cl$ -Puffer vom gleichen  $p_H$  nicht ersetzen.

<sup>18)</sup> Graßmann u. Hanschke<sup>9)</sup> fanden dies ebenfalls für Thioglykolsäure und SH-Glutathion.

0.10).  $\alpha$ -Sulphydryl-zimtsäure (VII) ist überhaupt nicht mehr gut bestimmbar. Thiomilchsäure (V) und Cystein (I) geben noch für bequeme Messungen hinreichende Farbintensitäten ( $E_k = 0.685$  und  $0.42$ ) (vergl. Tab. 1, B).

Die Gleichung 3 bildet die Grundlage der Bestimmung von Disulfiden mit Nitroprussidnatrium. Aus einem Mol. Cystin entsteht mit KCN ein Mol. Cystein (III, 3). KCN läßt man in etwa 100-fachem Überschuß rund 1 Stde. einwirken. Der Vergleich der Farbintensitäten bei Cystein- und Cystin-Bestimmungen liefert so den Beweis für die Richtigkeit der Umsetzung nach Gleich. 3.

Die Einwirkung von KCN auf eine Reihe von Disulfiden verlief ebenfalls ganz unerwartet (V). Aus der colorimetrischen Bestimmung der entstandenen SH-Verbindung mit Nitroprussidnatrium war ja ohne weiteres auf den Verlauf der Disproportionierung der SS-Bindung rückzuschließen. Die Disulfide zeigten dabei im wesentlichen die gleichen Unterschiede in ihrem Reaktionsvermögen wie gegenüber Sulfit (Tab. 6, B). Wiederum wurden Dithio-dilactyl-, Disulfid-bernsteinsäure, Diphenyl-, Tetramethyl- und Tetraphenyl-dithiodiglykolsäure auch von KCN nicht angegriffen. Dithio-diglykol- und Dithio-dihydracrylsäure „reduzierte“ KCN keineswegs zu 50%, sondern in beiden Fällen nur zu 33%. Ob sich Cystamin und Diformyl-cystin glatt umsetzen, läßt sich nicht genau sagen, da die entsprechenden SH-Verbindungen nicht vermessen wurden. Aus den verhältnismäßig hohen Farbintensitäten (verglichen mit Cystin) scheint aber hervorzugehen, daß es bei diesen nahen Verwandten des Cystins der Fall ist. Aber auch das fügt sich ganz gut dem Verhalten dieser Substrate Sulfit gegenüber ein. Distyryl-disulfid-dicarbon-säure läßt sich so nicht untersuchen, da schon die SH-Verbindung nicht erfaßbar war. Man sieht aus allem deutlich, daß die Methode der Cystinbestimmung mit Nitroprussidnatrium nicht ohne weiteres auf andere Disulfide übertragen werden darf.

Das prinzipiell gleiche Verhalten von Sulfit und Cyanid in bezug auf die Sprengung der SS-Bindung deutet an, daß es sich hier um eine konstitutions-spezifische Eigenschaft der Disulfide handelt. Besonders auffallend ist, daß die Unterschiede schon unter so gelinden Reaktionsbedingungen zutage treten. Cystin allein reagiert unter den gewählten Bedingungen leicht und glatt mit Sulfit und Cyanid. Es wäre denkbar, daß hierin die Zweckmäßigkeit der Cystinstruktur für zellphysiologische Bedürfnisse zum Ausdruck kommt. Ohne Zweifel hängen diese Fragen auch eng mit dem Redoxpotential der SH-SS-Systeme zusammen. Erwähnt seien schließlich noch Beziehungen, die sich aus den vorliegenden Modellversuchen zu dem Problem der Ferment-aktivierung ergeben. Bersin<sup>19)</sup> verglich die aktivierende Wirkung der natürlichen Phytokinase auf Papain mit der der zellfremden Substrate Thioglykol- und Thiomilchsäure. Sollte es ein Zufall sein, daß jene SH-Verbindungen, deren Disulfide nicht glatt mit Sulfit und Cyanid reagieren, schlechtere Aktivatoren darstellen? Wir sind im Begriff, die Ferment-Aktivierung in dieser Richtung zu untersuchen<sup>20)</sup>. Vielleicht werden dann auch die noch keine

<sup>19)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **220**, 209 [1933].

<sup>20)</sup>  $\alpha$ -Sulphydryl-zimtsäure ist z. B. ein guter Aktivator für Papain (Versuche von cand. chem. M. Fischer).

einheitliche Deutung zulassenden Versuche von E. Maschmann und E. Helmer<sup>21)</sup> über die Aktivierbarkeit von Kathepsin und Papain durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sulphydryl-carbonsäuren in einem neuen Licht erscheinen<sup>22)</sup>.

Wir sind der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Pulfrich-Photometers zu Dank verpflichtet. Der eine von uns (Ludwig) dankt ferner für ein Stipendium aus der I.-G.-Chemikerhilfe.

### Beschreibung der Versuche <sup>3)</sup>.

Sämtliche colorimetrischen Messungen sind mittels des Pulfrichschen Photometers der Fa. Zeiß-Jena nach der Substitutionsmethode durchgeführt worden. Die Auswahl der Schichtdicke richtet sich nach der Farbintensität. Die Größe der Absorption ist aus den jeweils nur angegebenen Extinktionskoeffizienten Ek ersichtlich.

#### I) Colorimetrische Bestimmung von SH-Verbindungen mit Folin-Reagens.

Die Darstellung des Reagenses aus Natriumwolframat und Phosphorsäure erfolgte nach den neuesten Angaben von O. Folin<sup>24)</sup>. Wichtig ist die Verwendung eines molybdänfreien Wolframates. Die Prüfung auf Molybdängehalt wurde nach O. Folin und H. Trimble<sup>25)</sup> mit Kaliumxanthogenat vorgenommen.

1) Bestimmungen ohne Sulfit. Die Ansätze zeigten folgende Zusammensetzung: 1 ccm einer 0.01-*m.* Lösung der SH-Verbindung + 13 ccm 2-*m.* Acetatpuffer vom  $p_H$  5.2 + 4 ccm Folin-Reagens. 30 Min. stehen lassen. Dann wurde mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und colorimetriert. Cysteinchlorhydrat, Thioglykol-, Thiomilch-, Thioäpfel- und Thiohydracrylsäure waren in 0.2-*n.*  $H_2SO_4$  gelöst, die übrigen Substanzen in 0.1-*m.*  $NaHCO_3$ . Cysteinchlorhydrat krystallisierte man 2-mal aus 5-*n.*  $HCl$  um und zog es mehrmals nach O. Warburg<sup>26)</sup> mit Aceton aus. Thioglykol-<sup>27)</sup>, Thiomilch- und Thiohydracrylsäure waren frisch im Vak. destilliert ( $N_2$ ). Der Gehalt ihrer Lösungen war durch jodometrische Titration eingestellt worden. Die übrigen SH-Verbindungen<sup>28)</sup> wurden eingewogen. Die Ansätze hatten ein  $p_H$  um 5.1 (colorimetrische Bestimmung mittels Stufenphotometers ohne Substrat). Konzentration der SH-Verbindung =  $2 \times 10^{-4}$ -*m.* Tab. 1 enthält unter A die mit Filter S 72 gefundenen Ek. (Blindwerte berücksichtigt)<sup>29)</sup>:

<sup>21)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **222**, 207 [1933].

<sup>22)</sup> Zur Zeit werden auch die beiden Glutathionformen unter den hier dargelegten Verhältnissen untersucht. <sup>23)</sup> Einige Kontrollversuche führte Dr. H. Eck durch.

<sup>24)</sup> Journ. biol. Chem. **106**, 311 [1934]; vergl. A. Fujita u. T. Ebihara, Biochem. Ztschr. **290**, 182 [1937]. <sup>25)</sup> Journ. biol. Chem. **60**, 473 [1924].

<sup>26)</sup> Biochem. Ztschr. **187**, 255 [1927].

<sup>27)</sup> Als Thioglykolsäure-Präparat eignet sich auch gut das leicht zu handhabende Zinknatriumsalz, das uns in freundlicher Weise die I.-G. Farbenindustrie A.-G., Werk Mainkur, überließ.

<sup>28)</sup> Über ihre Darstellung und Reinigung vergl. unsere früheren Mitteilungen.

<sup>29)</sup> In der 1 cm-Küvette ermittelt.

Tabelle 1.

Substrat	mg in	A	B
	50 ccm	Ek	Ek
Cystein, HO <sub>2</sub> C·CH(NH <sub>2</sub> )·CH <sub>2</sub> ·SH (I) .....	1.21	0.81	0.42
Thioglykolsäure, HO <sub>2</sub> C·CH <sub>2</sub> ·SH (II) .....	0.92	0.87	1.04
Dimethyl-thioglykolsäure, HO <sub>2</sub> C·C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·SH (III) .....	1.20	0.76	0.20
Diphenyl-thioglykolsäure, HO <sub>2</sub> C·C(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> ·SH (IV) .....	2.44	0.835	0.10
Thiomilchsäure, HO <sub>2</sub> C·CH(CH <sub>3</sub> )·SH (V) .....	1.06	0.87	0.685
Thioäpfelsäure, HO <sub>2</sub> C·CH(CH <sub>2</sub> ·CO <sub>2</sub> H)·SH (VI) .....	1.50	0.79	0.24
α-Sulphydryl-zimtsäure, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ·CH:C(CO <sub>2</sub> H)·SH (VII) ...	1.80	0.82	0
Thiohydracrylsäure, HO <sub>2</sub> C·CH <sub>2</sub> ·CH <sub>2</sub> ·SH (VIII) .....	1.06	0.43	0.86

2) Bestimmungen mit Sulfit: Die in Tab. 2 verzeichneten SH-Verbindungen sind vermessen worden. Ansätze: 1 ccm einer 0.01-*m.* Substratlösung in 0.2-*n.* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (I und VIII) oder 0.1-*m.* NaHCO<sub>3</sub> (VII) + 13 ccm 2-*m.* Acetatpuffer vom p<sub>H</sub> 5.2 + 2 ccm 20-proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung + 4 ccm Folin-Reagens. 30 Min. stehen lassen. Dann mit Wasser auf 50 ccm auffüllen. Für Blindwerte gleicher Ansatz nur ohne Substrat. Substratkonzentration =  $2 \times 10^{-4}$ -*m.*, Sulfitkonzentration etwa  $6 \times 10^{-2}$ -*m.* Es ergaben sich folgende Ek (Filter S 72, Tab. 2):

Tabelle 2.

Substrat	mg in	Ek
	50 ccm	
Cystein (I) .....	1.21	1.60
α-Sulphydryl-zimtsäure (VII) ...	1.80	1.50
Thiohydracrylsäure (VIII) ....	1.06	1.38

### 3) Bestimmung von Thiohydracrylsäure in Bicarbonat-Lösung:

a) 1 ccm 0.01-*m.* Lösung (jodometrisch eingestellt) in 0.2-*n.* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.06 mg R.SH + 10 ccm gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung + 4 ccm Folin-Reagens. Nach 10 Min. wurde auf 50 ccm aufgefüllt. Nach 2 Stdn. ergab sich ein Ek von 0.80 (Filter S 72). — b) Der gleiche Ansatz wie unter a, nur wurden vor Zusatz des Folin-Reagens 2 ccm 20-proz. Sulfit-Lösung zugegeben. Nach 2 Stdn. war jetzt Ek = 1.36.

## II) Colorimetrische Bestimmung von SH-Verbindungen mit Nitroprussidnatrium.

1) Die SH-Verbindungen der Tab. 1 sind vermessen worden. Bezüglich der Substrate und ihrer Lösungen gilt das unter I, 1 gesagte. Ansätze: 1 ccm einer 0.01-*m.* R.SH-Lösung + 5 ccm Glykokoll-Puffer vom p<sub>H</sub> 10.4<sup>30)</sup> + 1 ccm *m.* KCN im gleichen Puffer + 2 ccm Nitroprussidnatrium-Lösung in Wasser (0.6 g Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2 H<sub>2</sub>O in 10 ccm, stets frisch). Man füllte sogleich auf 50 ccm auf und colorimetrierte sofort (innerhalb weniger Min.). Messungen mit dem Grünfilter S 53 (Filterschwerpunkt bei 530 mμ). In Tab. 1 sind die gefundenen Ek unter B aufgeführt. Die beiden Hälften des Photometergesichtsfeldes haben nicht genau den gleichen Farbton, was die Genauigkeit beeinträchtigt. Die p<sub>H</sub>-Kontrolle mit dem Photometer in den Ansätzen ergab einen

<sup>30)</sup> 55 ccm *m.*-Glykokoll-Lösung (7.505 g Glykokoll + 5.85 g NaCl in 100 ccm H<sub>2</sub>O) + 45 ccm *m.*-NaOH.



Wert von 10.3 (1 ccm 0.01-*m.* Cystin in 0.2-*n.*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  als Substrat). Konzentration von  $\text{R.SH} = 2 \times 10^{-4}$ -*m.*, von  $\text{KCN} = 2 \times 10^{-2}$ -*m.*, von Nitroprussidnatrium  $8 \times 10^{-3}$ -*m.*

2) Um die Beständigkeit der roten Farbe zu untersuchen, wurde die Farbintensität im Photometer über längere Zeiten an Cystein, Thioglykol-, Thiomilch- und Thiohydracrylsäure verfolgt (in Tab. 3 die Ansätze a mit, die Ansätze b ohne KCN). Dabei war es sehr wesentlich, ob die Küvetten jedes Mal frisch aus der Vorratslösung im Meßkolben, der im Dunkeln stand, gefüllt wurden. Man führte dies nur bei Thiomilch- und Thiohydracrylsäure durch. Ansätze bei gleicher Substratkonzentration wie oben beschrieben. In Tab. 3 sind die nach verschiedenen Zeiten beobachteten Ek zusammengestellt (Filter S 53). Ohne KCN verblaßt die Farbe so rasch, daß die Genauigkeit der Werte nicht mehr sehr groß ist. Die Messungen müssen stets sehr rasch durchgeführt werden.

Tabelle 3.

Minuten		2	10	20	30	40
Cystein (I) .....	a	0.42	0.36	0.32	0.28	0.24
	b	0.24	0.10	0.02	—	—
Thioglykolsäure (II) .....	a	1.04	0.96	0.76	0.60	0.52
	b	0.96	0.48	0.20	0.09	0.06
Thiomilchsäure (V) .....	a	0.685	0.655	0.64	0.62	—
	b	0.59	0.48	0.41	0.36	—
Thiohydracrylsäure (VIII) .....	a	0.86	0.82	0.75	0.71	—
	b	0.81	0.73	0.67	0.60	—

### III) Colorimetrische Bestimmung von Cystin.

1) Bestimmung mit Folin-Reagens. Ansatz: 1 ccm 0.01-*m.* Cystinlösung in 0.2-*n.*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit 2.40 mg RSSR + 13 ccm 2-*m.* Acetat-Puffer vom  $\text{pH}$  5.2 + 2 ccm 20-proz. Na-Sulfit-Lösung<sup>31)</sup>. 10 Min. warten. Nun 4 ccm Folin-Reagens zufügen und nochmals 30 Min. warten. Schließlich wird auf 30 ccm aufgefüllt<sup>32)</sup>. Konzentration von Cystin  $2 \times 10^{-4}$ -*m.*, von Sulfit  $6.4 \times 10^{-2}$ -*m.* Die Sulfitkonzentration kann bis auf  $4.5 \times 10^{-2}$ -*m.* absinken. Durch die Reduktionswirkung des Sulfits allein erhält man einen beträchtlichen Blindwert. Es ergab sich  $\text{Ek} = 1.62$  (Filter S 72).

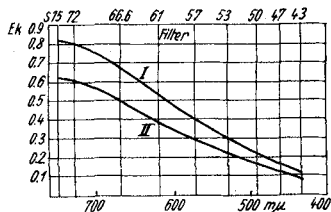


Fig. 3.

Absorptionskurven der reduzierten Stufe von 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure (Folin-Reagens).

die ermittelten Ek gegen die Wellenlänge aufgetragen. Zusammensetzung der Ansätze wie oben (Kurve I 1.20 mg Cystin/50 ccm, Kurve II 0.96 mg/50 ccm).

<sup>31)</sup> Die Sulfitlösung braucht nicht stets frisch angesetzt zu werden. Gut verschlossen und in dunklen Flaschen aufbewahrt, ist sie einige Wochen lang verwendbar, vorausgesetzt, daß der Gehalt nicht zu sehr absinkt. Blindwert ab und zu neu bestimmen.

<sup>32)</sup> Es kann in der 0.5 cm-Küvette colorimetriert werden.

2) Gültigkeit des Beerschen Gesetzes. Tab. 4 enthält die für einen weiten Konzentrationsbereich mit den Filtern S 72 und S 57 ermittelten Ek. Ansätze wie üblich (StammLösung war eine 0.01-*m.* Lösung von Cystin in 0.2-*n.* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; vgl. auch Fig. 1):

Tabelle 4.

mg Cystin in 100 ccm	0.24	0.48	0.72	0.96	1.2	1.44
Mol-Konzentrat. . . .	$1 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-5}$
Ek f. Filter S 72 . . .	0.053	0.127	0.203	0.303	0.37	0.453
Ek f. Filter S 57 . . .	0.025	0.031	0.034	0.12	0.19	0.225
mg Cystin in 100 ccm	1.68	1.92	2.16	2.4	2.64	2.88
Mol-Konzentrat. . . .	$7 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-5}$	$9 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-4}$
Ek f. Filter S 72 . . .	0.538	0.61	0.69	0.79	0.84	0.94
Ek f. Filter S 57 . . .	0.275	0.302	0.352	0.395	0.425	0.472
mg Cystin in 100 ccm	3.12	3.36	4.8	7.2	9.6	
Mol-Konzentrat. . . .	$1.3 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	
Ek f. Filter S 72 . . .	1.04	1.13	1.6	2.44	3.19	
Ek f. Filter S 57 . . .	0.52	0.59	0.8	1.22	1.61	

3) Bestimmung mit Nitroprussidnatrium. Ansatz: 1 ccm 0.01-*m.* Cystinlösung in 0.2-*n.* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit 2.40 mg Cystin + 5 ccm Glykokoll-Puffer vom p<sub>H</sub> 10.4 + 1 ccm *m.*-KCN im gleichen Puffer. 60 Min. stehen lassen. Schließlich 2 ccm 0.2-*m.* Nitroprussidnatrium-Lösung zugeben, auf 50 ccm auffüllen und sofort colorimetrieren. Konzentration von Cystin  $2 \times 10^{-4}$ -*m.*, von KCN  $2 \times 10^{-2}$ -*m.*, von Nitroprussidnatrium  $8 \times 10^{-3}$ -*m.* Ek war = 0.44 (Filter S 53). Zwischen Farbstärke und Cystinkonzentration bestand annähernd Proportionalität, wie aus Tab. 5 hervorgeht:

Tabelle 5.

mg Cystin/50 ccm . . . . .	2.40	3.00	3.60	4.80
Ek . . . . .	0.45	0.53	0.62	0.74
Ek/mg . . . . .	0.19	0.18	0.17	0.155

#### IV) Einwirkung von Natriumsulfit auf Disulfide.

1) a) Es wurden 0.01-*m.* Lösungen der Disulfid-carbonsäuren (reinste Präparate) in 0.1-*m.* NaHCO<sub>3</sub> benutzt. Nur Cystin löste man in 0.2-*n.* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Tetraphenyl-dithio-diglykolsäure in 0.4-*n.* NaOH. Ansätze: 1 ccm Substratlösung + 13 ccm 2-*m.* Acetat-Puffer vom p<sub>H</sub> 5.2 + 1 ccm 13.6-proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung + 4 ccm Folin-Reagens und sofort auf 50 ccm auffüllen. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Ek bestimmt. Konzentration der Disulfide  $2 \times 10^{-4}$ -*m.*, von Sulfit  $2.2 \times 10^{-2}$ -*m.* Ergebnisse in Tab. 6 unter A, a (Filter S 72).

b) Die Ek unter A, b sind bei der Sulfitkonzentration von  $4.4 \times 10^{-2}$ -*m.* (2 ccm 13.6-proz. Sulfit) unter sonst völlig gleichen Bedingungen ermittelt worden. Substratkonzentration ebenfalls  $2 \times 10^{-4}$ -*m.*

2) Bestimmung von Distyryl-disulfid-dicarbonensäure mit Folin-Reagens. Ansatz: 1 ccm 0.01-*m.* Lösung in 0.1-*m.* NaHCO<sub>3</sub> mit 3.58 mg RSSR + 13 ccm 2-*m.* Acetat-Puffer vom p<sub>H</sub> 5.2 + 2 ccm 20-proz. Sulfit. 10 Min. stehen lassen.

Dann 4 ccm Folin-Reagens zusetzen und 30 Min. warten. Schließlich auf 50 ccm auffüllen. Konzentration des Disulfides  $2 \times 10^{-4}$ -m., von Sulfid  $6.4 \times 10^{-2}$ -m. Ek war 1.39 (Filter S 72). Farbstärke blieb über Std. beständig.

Tabelle 6.

Reduktion von Disulfiden durch Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (A) und KCN (B).

Substrat	A						B	
	Bestimmungen mit Folin-Reagens						Best. mit Nitroprussid-	
	30 Min.		4 Stdn.		8 Stdn.		14 Stdn.	60 Min.
	a	b	a	b	a	b	a	
Distyryl-disulfid-dicarbon- säure .....	1.34	—	1.40	—	1.42	—	1.43	0.01
Cystin .....	1.01	1.62	1.30	1.62	1.42	1.64	1.44	0.48
Cystamin (Chlorhydrat) ...	0.52	1.42	1.00	1.62	1.24	1.58	1.39	0.55
Diformyl-cystin .....	0.20	1.21	0.70	1.68	0.91	1.64	1.17	0.46
Dithio-diglykolsäure .....	0.12	0.82	0.48	1.21	0.66	1.50	0.87	0.69
Dithio-dihydracrylsäure ..	0.10	0.66	0.47	1.20	0.70	1.48	0.82	0.57
Dithio-dilactylsäure .....	0	—	—	—	—	—	0.025	0.09
Disulfid-bernsteinsäure ...	0.01	—	—	—	—	—	0.05	0.06
Diphenyl-dithio-diglykol- säure .....	0	—	—	—	—	—	0.025	0.06
Tetramethyl-dithio-diglykol- säure .....	0	—	—	—	—	—	0	0
Tetraphenyl-dithio-diglykol- säure .....	0.01	—	—	—	—	—	0.07	0

#### V) Einwirkung von Kaliumcyanid auf Disulfide.

Man verwandte die gleichen Substratlösungen wie unter IV. Ansätze: 1 ccm 0.01-m. RSSR + 5 ccm *m*-Glykokoll-Puffer vom p<sub>H</sub> 10.4 + 1 ccm *m*-KCN im gleichen Puffer. 1 Stde. stehen lassen. Dann setzte man 2 ccm 0.2-m. Nitroprussidnatrium-Lösung zu, füllte rasch auf 50 ccm auf und colorimetrierte sofort bei der geeigneten Schichtdicke. Konzentration der Disulfide  $2 \times 10^{-4}$ -m., von KCN  $2 \times 10^{-2}$ -m. Die mit Filter S 53 gefundenen Ek enthält Tab. 6 unter B.

### 247. Yun-Hwang Chen: Über die Oxydation von Ergosterin B<sub>3</sub>.

[Aus d. Allgem. Chem. Universitätslaborat. Göttingen.]

(Eingegangen am 26. Mai 1937.)

Windaus hat bei Untersuchungen über die Isomerisierung des Ergosterins aus der Tatsache, daß das Ergosterin B<sub>3</sub> ein Absorptionsmaximum bei 248 m $\mu$  besitzt und daß es leicht Maleinsäure-anhydrid addiert, den wichtigen Schluß gezogen, daß es ein System konjugierter Doppelbindungen enthält<sup>1)</sup> Die Mol.-Refraktion des Ergosterins B<sub>3</sub> spricht ebenso für diese Auffassung<sup>2)</sup> Die konjugierten Doppelbindungen sollen auf die Ringe B und D verteilt sein

<sup>1)</sup> Windaus, Dithmar, Murke u. Suckfüll, A. 488, 98 [1931].

<sup>2)</sup> Auwers u. Wolter, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, 106 [1931].