

### 174. Karl Heinrich Slotta und Walter Forster: Schlangengifte, IV. Mittel.: Quantitative Bestimmung der schwefelhaltigen Bausteine.

[Aus d. Chem. Abteil. d. Instituto Butantan, São Paulo, Brasilien.]

(Eingegangen am 11. April 1938.)

Wie wir schon in der II. Mitteilung dieser Reihe<sup>1)</sup> nachgewiesen haben, liegt ein Teil des Schwefels der Schlangengifte in Form von -S-S--Brücken vor, deren Vorhandensein für die Wirksamkeit der Gifte von ausschlaggebender Bedeutung ist. Es interessierte nun, nachdem die Reindarstellung des Giftes der Klapperschlange (*Crotalus t. terrificus*) gelungen war<sup>2)</sup>, festzustellen, welche schwefelhaltigen Bausteine darin überhaupt enthalten sind. Wir können in der vorliegenden Arbeit zeigen, in welchem Verhältnis sich der Schwefel des Giftes auf die einzelnen schwefelhaltigen Bausteine dieses Eiweißstoffes verteilt. Wir hydrolysierten amorphes Crotoxin<sup>2)</sup> mit einem Salzsäure-Ameisensäure-Gemisch<sup>3)</sup>, um in dem Hydrolysat die uns interessierenden schwefelhaltigen Substanzen zu bestimmen.

Zuerst untersuchten wir den Gehalt der Hydrolysate des Crotoxins an Cystin(-S-S-), da dieses die häufigste schwefelhaltige Aminosäure ist mit Hilfe der von M. X. Sullivan<sup>4)</sup> angegebenen Methode. Diese erfäßt nur die freie, nicht in Peptiden gebundene Aminosäure und auch keines ihrer Homologen. Mit dieser Methode wurden 13.1% Cystin(-S-S-) gefunden, d. h. 87.5% des Gesamtschwefels, der im Crotoxin 4.0% beträgt. Die Frage war also, welche weiteren schwefelhaltigen Verbindungen noch im Gifte vorhanden sind, und zu ihrer Lösung stellten wir folgende Überlegung an, die am besten an Hand einer Übersicht klar wird:

| Es werden erfäßt                                      | durch die Methoden von |          |              |              |
|---|------------------------|----------|--------------|--------------|
|   | Folin                  | Sullivan | Bärnstein    |              |
|   |                        |          | 1. Titration | 2. Titration |
| 1) Cystin(-S-S-) .....                                | ja                     | ja       | ja           | nein         |
| 2) andere (-S-S-)haltige Aminosäuren .....            | ja                     | nein     | ja           | nein         |
| 3) Methionin .....                                    | nein                   | nein     | nein         | ja           |
| 4) andere am Schwefel substituierte Aminosäuren ..... | nein                   | nein     | ja           | nein         |
| 5) „Thiolactone“ .....                                | ja                     | nein     | nein         | ja           |

Während die Sullivansche Methode, wie schon einleitend gesagt, nur Cystin(-S-S-) erfäßt, spricht die vielverwandte Folinsche<sup>5)</sup> auch auf andere Disulfid-Thiol-Systeme an. Wir fanden mit ihr für unseren Fall 13.3% Cystin(-S-S-), also eine innerhalb der Fehlergrenzen mit der nach Sullivan gefundenen gleiche Menge; daraus folgt, daß im Crotoxin keine andere -S-S-Verbindung außer Cystin(-S-S-) vorliegt. Auch wenn der Schwefel in einer für Eiweißverbindungen gänzlich neuen Bindungsart, nämlich als Thiolacton, vorläge, würde er von der Folinschen Methode

<sup>1)</sup> K. H. Slotta u. H. L. Fraenkel-Conrat, B. 71, 264 [1938].

<sup>2)</sup> K. H. Slotta u. H. L. Fraenkel-Conrat, B. 71, 1076 [1938].

<sup>3)</sup> G. L. Miller u. V. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. 118, 101 [1937].

<sup>4)</sup> Publ. Health Rep. suppl. 78 [1929].

<sup>5)</sup> O. Folin u. A. D. Marenzi, Journ. biol. Chem. 83, 103 [1929].

erfaßt werden, nicht aber von der Sullivanschen, so daß infolge der praktischen Gleichheit der beiden Werte auch diese Möglichkeit auszuschließen ist.

Die wahrscheinlichste weitere Annahme war nun, daß außer Cystin (-S-S-) noch Methionin,  $\text{CH}_3\cdot\text{S}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{CO}_2\text{H}$ , im Crotoxin vorhanden wäre. Zu dessen Bestimmung kann man nach H. D. Bärnstein<sup>6)</sup> folgendermaßen verfahren: Das Protein wird mit Jodwasserstoffsäure hydrolysiert, wobei das Methyl vom Schwefel abgespalten und quantitativ bestimmt werden kann. Im Hydrolysat läßt sich das durch die Jodwasserstoff-Reduktion des Cystins(-S-S-) entstehende Cystein(-SH) mit Kaliumbiodat titrieren, während das aus dem Methionin gebildete Homocystein in dieser sauren Lösung einen Thiolacton-Ring schließt, der erst im schwach alkalischen Gebiet aufgeht. Macht man also mit Ammoniak unter gewissen technischen Vorsichtsmaßregeln alkalisch, so erhält man das Homocystein-Salz mit freien -SH-Gruppen, die sich durch gemessenes, zugesetztes Tetrathionat quantitativ zur -S-S-Verbindung dehydrieren lassen. Durch Titration mit Biodat kann das dabei entstandene Thiosulfat ermittelt werden, woraus sich der Methionin-Gehalt der Lösung sehr scharf ergibt. So fanden wir bei Probeanalysen z. B. von 9.15 mg eingewogenem Methionin 9.10 mg wieder. Diese titrimetrische Bestimmung des Methionins erscheint uns für kleine Protein-Mengen viel genauer als die Bestimmung des abgespaltenen Jodmethyls, mit der wir mehrmals, z. B. auch bei kristallisiertem Insulin, zu hohe Werte erhielten. Wir bestimmten daher mit der Bärnsteinschen Titrations-Methode sowohl Cystin(-S-S-) wie Methionin und fanden für Cystin(-S-S-) 13.2 %, also genau denselben Wert wie mit den Methoden von Sullivan und Folin. Für Methionin ergab sich 1.36 %, was 7.3 % des Schwefels im Crotoxin entspricht. Andere, noch nicht bekannte, aber immerhin denkbare, am Schwefel substituierte Aminosäuren wären unter den Bärnsteinschen Versuchsbedingungen mit dem Cystin(-S-S-) zusammen erfaßt worden, denn nur die  $\delta$ -Stellung des Schwefels im Methionin führt zur Bildung des Thiolacton-Ringes und damit zur Möglichkeit, das Methionin vom Cystin(-S-S-) getrennt zu bestimmen.

Andererseits kann man folgende Überlegung anstellen: Aus dem sehr genau zu ermittelnden Methionin-Gehalt des Crotoxins ergibt sich ein Mindest-Molekulargewicht von 11000; nach den Svedbergschen Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen ist es höchstwahrscheinlich, daß das 3- oder 6-fache dieses Wertes das wahre Molekulargewicht des Crotoxins darstellt. Rechnet man vorläufig mit dem niedrigeren Molekulargewicht von 33000, so verteilt sich der aufgeklärte Schwefel im genauen Verhältnis von 18 Cystin(-S-S-) zu 3 Methionin-Resten. Diese Zahlen lassen sich den von Max Bergmann<sup>7)</sup> beim Studium der Periodizität von Aminosäuren in Proteinen ermittelten Grundzahlen ( $18 = 2^1 \times 3^2$ ;  $3 = 2^0 \times 3^1$ ) zwanglos einordnen.

Hat aber das Crotoxin-Molekül wirklich das Molekulargewicht von 33000, so ergibt sich aus dem sehr genau bestimmten Schwefelgehalt von 4.0 % ein Gehalt an 41 Schwefelatomen, von denen  $36 + 3$  als Cystin(-S-S-) und Methionin vorhanden sind. Die noch zu erwähnende Analyse der schwefelhaltigen Bausteine eines anderen Schlangengiftes zeigte uns nun, daß bei der Hydrolysenmethode nach Bärnstein keine Zersetzung stattfindet; und daß

<sup>6)</sup> Journ. biol. Chem. **106**, 453 [1934].

<sup>7)</sup> M. Bergmann u. K. Niemann, Science **86**, 187 [1937].

sich der so aufgeklärte Cystin(-S-S)- plus Methionin-Wert vollkommen mit dem Schwefel-Werte der Verbrennungsanalyse decken kann. Wir neigen deshalb mehr der Ansicht zu, daß im Crotoxin noch 2 von den 41 Schwefel-Atomen in einer bisher nicht erfaßbaren Bindungsart vorliegen. Zu betonen bleibt dabei, daß es sich nicht um eine andere -S-S- oder -SH-Verbindung, nicht um ein Thiolacton und auch nicht um ein am Schwefel alkyliertes Thiol handelt.

Wie wir früher<sup>1)</sup> gezeigt haben, liegt auch in dem gänzlich andersartig wirkenden Gift von *Bothrops jararaca* der Schwefel in -S-S-Brückenbindung vor, die für die Wirkung von ausschlaggebender Bedeutung ist. Wir haben deshalb auch die schwefelhaltigen Bausteine dieses Giftes aufgeklärt. Nun läßt sich *Bothrops*-Gift selbst nach dem Zusatz von Ameisensäure mit Salz- oder Schwefelsäure nicht ohne tiefgreifende Zersetzungserscheinungen hydrolysieren, und wir mußten deshalb von der Bestimmung des Cystins(-S-S-) nach Sullivan und Folin Abstand nehmen.

Bei der Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure treten aber die genannten Schwierigkeiten nicht auf, so daß wir Cystin(-S-S-) und Methionin nach Bärnstein<sup>6)</sup> gut bestimmen konnten. Wir verwandten nicht das Rohgift, sondern eine gereinigte, neurotoxisch voll wirksame Fraktion. Wir fanden im Mittel 5.73 % Cystin(-S-S-) und 1.08 % Methionin, woraus sich ein Schwefelgehalt von 1.75 % für das *Bothrops jararaca*-Gift errechnet, während der Mittelwert der ausgeführten Verbrennungsanalysen 1.74 % betrug.

### Beschreibung der Versuche.

Für die Analyse der Gifte erwies sich eine schonende, aber sehr energische Trocknung als unbedingt notwendig. Wir erreichten diese nur, wenn die Substanzen 2 Stdn. bei 100°/0.01 mm über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden. Die Giftigkeit litt dabei nicht. Die angegebenen Analysenwerte in % beziehen sich auf die so erhaltenen, vollkommen wasserfreien Präparate.

Da die Frage der Trocknung solcher aktiven, außerordentlich hygroskopischen Eiweiß-Substanzen von allgemeinerem Interesse ist, geben wir unsere Erfahrungen über die Trocknung der Gifte unter verschiedenen Bedingungen in Gestalt folgender Gewichtsverlusts-Kurven wieder, die wohl keiner weiteren Erklärung bedürfen (s. Abbild.). Wie schon du Vigneaud<sup>3)</sup> gefunden hat, können im Falle des Insulins durch ungenügendes Trocknen die Schwefelwerte bis zu 0.3% zu niedrig ausfallen. Die Schlangengifte sind ebenso, wenn nicht noch hygroskopischer als das Insulin.

I) Crotoxin, amorph, rein (GW = 3000, LW = 165, KW = 0).

1) Bestimmung des Gesamtschwefels nach Schöberl<sup>6)</sup>.

43.793 mg Sbst. gaben 15.608 mg Benzidinsulfat. — 22.872 mg Sbst. gaben 8.087 mg Benzidinsulfat.

Die Substanz hinterließ in jedem Falle nur Spuren von Rückstand. S = 4.05; 4.02. Mittel: S = 4.03%.

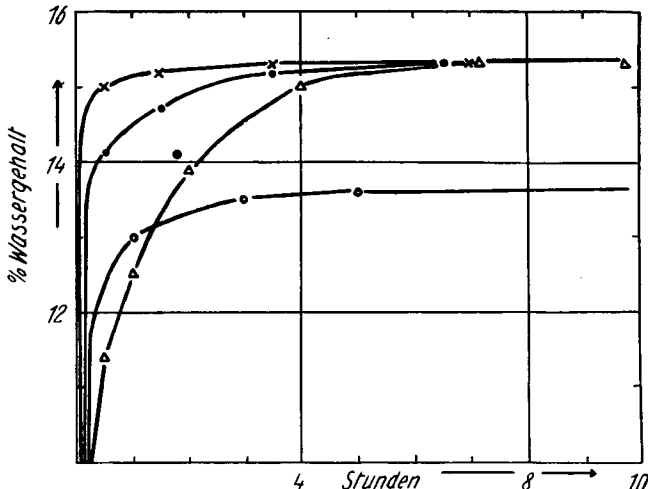
2) Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren.

a) Cystin(-S-S-) bestimmt als Cystein(-SH) nach Folin<sup>5)</sup> und Sullivan<sup>4)</sup>.

55.44 mg Sbst. wurden in einem Schliffkölbchen in 5.8 ccm konz. Salzsäure gelöst, 6.2 ccm reine Ameisensäure zugegeben und nach Aufsetzen des

<sup>6)</sup> A. Schöberl, *Angew. Chem.* 50, 334 [1937].

Schliffsteigrohres 48 Stdn. im Ölbade von 130—140° erhitzt. Nach Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die Hydrolyse nach dieser Zeit vollständig war. Danach wurde die Lösung bei 50 mm im Wasserbade zur Trockne gedampft und der Rückstand in 3 ccm Wasser gelöst. Nachdem diese Lösung durch Zugabe von 0.1-n. Natronlauge auf ein  $p_H$  von 3.5 gebracht worden war, wurde sie in einem Meßkölbchen zu 10 ccm aufgefüllt.



Trocknungskurven von *Crotalus t. terrificus*-Gift.

- x — Im Hochvakuum bei 100°, über  $P_2O_5$
- ● — " " " 54°, " "
- Δ — " " " 25°, " "
- ○ — Im trocknen Luftstrom bei 54°, 55 mm

Colorimetrische Auswertung nach Folin<sup>5)</sup>: Je 1 ccm der obigen Lösung, 1 ccm 0.5-n. Schwefelsäure und 1 ccm Wasser wurden in einen Meßkolben von 25 ccm gegeben. Es wurde eine Standardlösung von 8.071 mg reinem Cystin (-S-S-) in 10 ccm 0.5-n. Schwefelsäure hergestellt, von der 1 ccm mit 2 ccm Wasser in ein zweites 25-ccm-Kölbchen kam.

In jedes dieser beiden Meßkölbchen wurden folgende Reagenzien gegeben: a) 1 ccm einer 10-proz. Lösung von Natriumsulfit (20 g  $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$  auf 100 ccm mit Wasser gelöst); b) nach 1 Min. Stehenlassen: 5 ccm 18-proz. Natriumcarbonat-Lösung (18 g  $Na_2CO_3$ , wasserfrei, auf 100 ccm in Wasser gelöst); c) 1 ccm einer 10-proz. Lösung von Lithiumsulfat (11.6 g  $Li_2SO_4 \cdot H_2O$  auf 100 ccm mit Wasser gelöst); d) 2 ccm von Folin's Harnsäure-Reagens, das gegenüber der Originalangabe auf das 6-fache verdünnt worden war. Dieses Reagens war aus von uns nochmals gereinigtem Natriumwolframat von Schering-Kahlbaum ( $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ) nach den neuesten Angaben Folin's<sup>6)</sup> hergestellt worden; e) nach Umschütteln und 5 Min. Stehenlassen: 13 ccm einer 3-proz. Lösung von Natriumsulfit (6 g  $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$  auf 100 ccm mit Wasser gelöst).

Die colorimetrische Auswertung in einem Zweistufen-Dubosq-Colorimeter (Leitz) wurde sofort vorgenommen. Zur Kompensation der Eigenfarbe des Hydrolysats wurde eine Lösung benutzt, die genau wie die zu be-

stimmende hergestellt worden war, aber statt des Folinschen Reagenses 2 ccm Wasser enthielt. 30 mm Schichthöhe der zu untersuchenden Lösung entsprachen 27.83 mm Schichthöhe des Standards, der 0.807 mg Cystin (-S-S-) enthielt. Die zu bestimmende Lösung enthielt also pro ccm 0.75 mg Cystin(-S-S-), d. h. der Cystin(-S-S-)-Gehalt des Giftes betrug 13.5%.

Colorimetrische Auswertung nach Sullivan<sup>4)</sup>: 2 ccm des, wie oben beschrieben, neutralisierten Hydrolysats, die also 11.09 mg Gift entsprachen, wurden in einem 25-ccm-Erlenmeyer angesetzt. Gleichzeitig wurde eine Lösung von 1.558 mg Cystin(-S-S-) in 5 ccm 0.1-n. Salzsäure als Vergleichslösung ebenso wie folgt behandelt.

Zu dem Hydrolysat und der Standardlösung kamen: a) 2 ccm einer alkalischen Natriumcyanid-Lösung (5 g Natriumcyanid auf 100 ccm mit *n*-Natronlauge gelöst<sup>9)</sup>). Nach gutem Durchmischen blieben die Lösungen 10 Min. stehen; b) 1 ccm einer 0.5-proz. Lösung von frisch umgelöstem 1.2-naphthochinon-4-sulfonsaurem Natrium. Es wurde 10 Sek. geschüttelt; c) 5 ccm 10-proz. Natriumsulfit-Lösung (20 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ccm mit 0.5-n. Natronlauge gelöst). Die Lösungen blieben 30 Min. stehen; d) 1 ccm 2-proz. Natriumhydro-sulfit-Lösung (2 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  von Schering-Kahlbaum auf 100 ccm mit 0.5-n. Natronlauge gelöst).

Die beiden Lösungen wurden in dem genannten Apparat colorimetriert, wobei die Eigenfarbe der zu untersuchenden Lösung durch eine ebenso hergestellte Lösung kompensiert wurde, die nur 1 ccm Wasser statt des unter b) genannten Reagenses enthielt. 30 mm Schichthöhe der zu untersuchenden Lösung entsprachen 27.41 mm Standardlösung, woraus sich für das Gift ein Cystin(-S-S-)-Gehalt von 13.0% ergab.

Ein zweites Mal wurden 42.12 mg Crotoxin genau wie oben 48 Stdn. hydrolysiert. Von dem auf 10 ccm gebrachten Hydrolysat wurden 2 ccm zur Folin-Reaktion verwendet und mit 1 ccm eines Standards in der beschriebenen Weise verglichen, der 0.807 mg Cystin(-S-S-) enthielt. 20 mm Schichthöhe der unbekanntenen Lösung entsprachen 27.50 mm der Standardlösung; der Cystin(-S-S-)-Gehalt des Crotoxins ergab sich danach zu 13.2%. Zur Sullivan-Reaktion wurden 2 ccm der genannten Lösung benutzt, die mit 3 ccm einer Standardlösung verglichen wurde, die 0.3115 mg Cystin(-S-S-) pro ccm enthielt. 30 mm Schichthöhe der fraglichen Lösung entsprachen 35.51 mm der Standardlösung, woraus sich ein Cystin(-S-S-)-Gehalt des Crotoxins von 13.1% errechnet.

b) Cystin (-S-S-) und Methionin bestimmt nach Bärstein<sup>6)</sup>.

179.54 mg Crotoxin wurden in einem länglichen 25-ccm-Schliffkölbchen mit 5 ccm konstant siedender Jodwasserstoffsäure, die 1% Natriumhypophosphit ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) enthielt, unter Rückfluß und Durchleiten von reinstem Kohlendioxyd 5 Stdn. im Ölbade von 150° im Sieden gehalten. Das Hydrolysat wurde daraufhin auf ungefähr 3 ccm eingedampft, ein Kryställchen Natriumhypophosphit ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) zugegeben und 1 Min. aufgekocht. Das noch heiße Kölbchen wurde mit einem Schliffstopfen ver-

<sup>9)</sup> Wir arbeiteten bei der Ausführung der Sullivan-Reaktion in etwas stärker alkalischer Lösung als sonst üblich, wodurch sich eine Pufferung erübrigt, wie sie von anderen vorgeschlagen worden ist. Wir sind Hrn. Kollegen M. X. Sullivan für einen privaten Hinweis in dieser Richtung besonders dankbar.

schlossen und abgekühlt. Gleichzeitig wurde ein 25-ccm-Meßkölbchen mit reinstem Stickstoff gefüllt und in ihn durch einen kleinen Trichter das Hydrolysat hineinfltriert. Das Kölbchen wurde mit 4-proz. sauerstoff-freier und mit Stickstoff gesättigter Salzsäure 3-mal ausgespült und der Meßkolben mit derselben Säure auf 25 ccm aufgefüllt. Die schön hellgelb gefärbte Lösung enthielt kein freies Jod, wie die Stärkeprobe zeigte.

Zur Bestimmung des Cystins(-S-S-) wurden 10 ccm dieser Lösung in einem 50-ccm-Schliffrundkölbchen mit einem Krystall Kaliumjodid, etwas Stärkelösung und einem geringen Überschuß einer 0.01-n. Kaliumbijdodat( $\text{KHJ}_2\text{O}_8$ )-Lösung versetzt und das nicht zur Oxydation des Cysteins (-SH) zu Cystin(-S-S-) verbrauchte und deshalb ausgeschiedene Jod mit 0.01-n. Thiosulfat titriert. Es wurden in zwei Titrationen 7.91 und 7.96 ccm Kaliumbijdodat-Lösung verbraucht, woraus sich für die gesamte angewandte Crotoxin-Menge ein Cystin(-S-S-)-Gehalt von 13.2 bzw. 13.3% berechnet.

Zur Methionin-Bestimmung wurden zu der so entfärbten Lösung 3 Tropfen 0.5-proz. Phenolphthalein-Lösung und 2 ccm einer 0.01-n. Alkalitetrathionat-Lösung gegeben, die aus gleichen Mengen 0.01-n. Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) und Kaliumbijdodat( $\text{KHJ}_2\text{O}_8$ )-Lösung mit Kaliumjodid und etwas verd. Salzsäure kurz vorher hergestellt worden war. Auf den Schliffkolben mit der so vorbereiteten Lösung wurde ein Schliffstück gesetzt, an dem sich ein Tropftrichter mit Hahn und ein Absaugstutzen befand. Nachdem der Kolben auf ungefähr 50 mm Druck ausgepumpt worden war, wurde die Vakuumleitung abgesperrt und aus dem Trichter soviel konz. Ammoniak-Lösung zugegeben, daß die Lösung stark rot gefärbt war. Nach sehr vorsichtigem Öffnen des Vakuumhahnes verdampfte das überschüssige Ammoniak unter Aufschäumen. Nachdem die rote Lösung nun verschlossen 15 Min. gestanden hatte, wurde Luft in den Kolben gelassen, schnell mit 10 ccm 10-proz. Salzsäure angesäuert und das entstandene Thiosulfat mit 0.01-n. Kaliumbijdodat( $\text{KHJ}_2\text{O}_8$ )-Lösung titriert. Es wurden 0.68 ccm Kaliumbijdodat-Lösung verbraucht, woraus sich ein Methionin-Gehalt des Crotoxins von 1.41% errechnet.

In einem zweiten Versuche wurde von 86.54 mg Crotoxin ausgegangen und im ganzen ebenso verfahren. Nur wurde das Hydrolysat statt auf 25 ccm auf 10 ccm aufgefüllt, von denen je 5 ccm zu jedem der beiden Titrationsgänge benutzt wurden. Für die ersten Titrationen verbrauchten wir 4.70 und 4.68 ccm Kaliumbijdodat-Lösung, entsprechend 13.05 und 13.00% Cystin(-S-S-). Zu den zweiten Titrationen wurden 0.38 und 0.40 ccm Kaliumbijdodat-Lösung verbraucht, was 1.31 und 1.37% Methionin entspricht.

Zusammenstellung der für Crotoxin so ermittelten Werte:

S: 4.02; 4.05% (Crotoxin amorph), 3.96; 4.03% (Crotoxin kryst.),  
Mittelwert:  $4.01 \pm 0.05\%$ .

Cystin: 13.2; 13.5% (Folin)  
13.0; 13.1% (Sullivan)  
13.0; 13.1; 13.2; 13.3% (Bärnstein)  
Mittelwert:  $13.2 \pm 0.3\%$ , entsprechend  $87.6 \pm 2.3\%$  des Gesamtschwefels.

Methionin: 1.31; 1.37; 1.41% (Bärnstein)

Mittelwert  $1.36 \pm 0.05\%$ , entsprechend  $7.2 \pm 0.3\%$  des Gesamtschwefels.

II) Neurotoxisch voll wirksame, gereinigte Fraktion des Bothrops jararaca-Giftes.

1) Bestimmung des Gesamtschwefels nach Schöberl<sup>1)</sup>.

32.710 mg Sbst. ergaben 4.945 mg Benzidinsulfat. — 29.770 mg Sbst. ergaben 4.610 mg Benzidinsulfat.

Gef. S = 1.72; 1.76.

2) Bestimmung von Cystin(-S-S-) und Methionin nach Bärnstein<sup>6)</sup>.

198.81 mg Gift wurden ebenso wie beim Crotoxin beschrieben hydrolysiert und die erhaltene Lösung dann auf 25 ccm gebracht. Für den Titrationsgang wurden 2-mal je 10 ccm Lösung verwandt. Zur Titration auf Cystin(-S-S-) wurden 3.80 und 3.79 ccm, zu der auf Methionin 0.55 und 0.60 ccm Kaliumbijdodatlösung verbraucht, was einem Cystin(-S-S-)Gehalt von 5.75 und 5.73% sowie einem Methionin-Gehalt von 1.03 und 1.12% entspricht.

### 175. Fritz Zetzsche, Erich Lüscher und Hans E. Meyer: Die Kennzeichnung von Carbonsäuren als Ureide mit Hilfe der Carbodiimide (I. Mittel.).

[Aus d. Chem. Instituten d. Universitäten Bern u. Berlin; vorgetragen in der Sitzung d. Deutschen Chemischen Gesellschaft am 11. April 1938.]

(Eingegangen am 21. April 1938.)

Die von C. Schall<sup>1)</sup> am Beispiel der Essig-, Benzoe- und Thiobenzoesäure beobachtete Erscheinung, daß Carbonsäuren sich an Carbodiphenylimid zu den entsprechenden monoacylierten Diphenylharnstoffanlagern, hat trotz des anscheinend glatten Verlaufes der Reaktion keine Beachtung als Hilfsmittel zur Kennzeichnung von Carbonsäuren gefunden, obwohl M. Busch<sup>2)</sup> später das Verhalten der drei Aminobenzoesäuren und der Phthalsäure studierte. Da diese Reaktion, ähnlich wie die Veresterung mit Diazomethan, die Umwandlung einer Carbonsäure in ein Derivat ohne Mitwirkung von Alkalien wie bei der Phenacylbromid- und Dimethylsulfat-Methode, von Mineralsäuren wie bei der üblichen Veresterung, oder ohne Umwandlung in ein Säurechlorid als Zwischenprodukt ermöglicht und infolge der großen Reaktionsfähigkeit der Carbodiimide schon bei mäßiger Temperatur vor sich geht, schien sie uns geeignet, auch empfindliche Säuren zu kennzeichnen, zumal der Übergang in ein Ureid ein hohes Krystallisationsvermögen, verbunden mit einer Erhöhung des Schmelzpunktes, bezogen auf die zu Grunde liegende Säure, erwarten ließ. Diese Erwartungen veranlaßten uns, im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die Korkfettsäuren<sup>3)</sup> und die Sporopollenine<sup>4)</sup> die Reaktion von Schall zu erweitern.

1) Journ. prakt. Chem. [2] **64**, 261 [1901].

2) Journ. prakt. Chem. [2] **79**, 539 [1909].

3) Letzte Mittel.: Journ. prakt. Chem. **150**, 140 [1938].

4) Letzte Mittel.: Journ. prakt. Chem. **148**, 267 [1937].