

389. Alfons Schöberl und Friedrich Krumey: Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit von Sulfhydryl- und Disulfidgruppen in organischen Verbindungen.

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

(Eingegangen am 13. Oktober 1938.)

Die Tatsache, daß physiologisch wichtige Verbindungen in ihrem Molekül SH- oder SS-Gruppen enthalten, führt notwendigerweise immer mehr dazu, Thiole und Disulfide verschiedener Struktur in ihrer Wechselwirkung aufeinander zu studieren¹⁾. Es kann heute als sicher gelten, daß die Aktivität einer Reihe von biochemischen Wirkstoffen maßgebend durch ein Thiol-Disulfid-System beeinflußt wird. In diesem Zusammenhang erscheint die Untersuchung der Einwirkung von niedermolekularen SH- oder SS-Verbindungen auf hochmolekulare Naturstoffe von besonders vordringlicher Bedeutung²⁾. Nicht zuletzt ist dabei auch an die Succinodehydrase zu denken, bei deren Aktivierung neuerdings ebenfalls die Mitwirkung von SH-Gruppen angenommen wird³⁾. Bei den angedeuteten Problemstellungen spielt die Frage der Reaktionsfähigkeit einer in ein bestimmtes Molekül eingebauten SH-Gruppe eine wesentliche Rolle. Es wird nicht immer beachtet, daß das Vorhandensein der SH-Gruppe allein für eine angestrebte Wirksamkeit ihres Trägers nicht genügt. Thiole können hinsichtlich ihrer Reduktionskraft feine Unterschiede zeigen, die bisher in einfacher Weise nicht festlegbar waren.

Was schließlich die SS-Gruppe in biochemischen Wirkstoffen betrifft, so hat vor allem in jüngster Zeit die Einwirkung von Sulfid auf sie vermöge ihres charakteristischen Verlaufes eine gewisse Bedeutung erlangt⁴⁾. In der Diskussion über die schwefelhaltige Wirkgruppe von Schlangengift-Präparaten, die seit einiger Zeit zwischen F. Micheel⁵⁾ und K. H. Slotta⁶⁾ geführt wird, fand z. B. diese Reaktion Beachtung. Auch hier beeinflussen strukturelle Verhältnisse die Reaktionsfähigkeit der SS-Bindung, so daß nicht ohne weiteres von einem System auf das andere geschlossen werden darf.

Unter den dargelegten größeren Zusammenhängen sind Ergebnisse von Interesse, die wir in der letzten Zeit bei der eingehenden Beschäftigung mit dem zellphysiologisch wichtigen Glutathion erzielten. Dabei hat sich die Heranziehung einiger anderer Thiole und Disulfide zu vergleichenden Untersuchungen als nötig herausgestellt.

Jede Beschäftigung mit Glutathion in chemischer oder gar zellphysiologischer Beziehung hat eine zuverlässige Bestimmungsmethode zur unbedingten Voraussetzung. Unsere Bemühungen in dieser Richtung ließen die charakteristische Reaktionsfähigkeit der SH- bzw. SS-Gruppe in diesem Tripeptid besonders scharf hervortreten. Es zeigte sich nämlich, daß die vor kurzem ausführlich mitgeteilte Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von Cystin und Cystein mit 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure⁷⁾ wohl für SS-Glutathion,

¹⁾ vergl. Th. Bersin u. J. Steudel, B. **71**, 1015 [1938].

²⁾ Literatur s. bei Bersin u. Steudel, l. c.

³⁾ F. G. Hopkins u. E. J. Morgan, Biochem. Journ. **32**, 611 [1938]; H. v. Euler u. H. Hellström, Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B) **13**, Nr. 1 [1938].

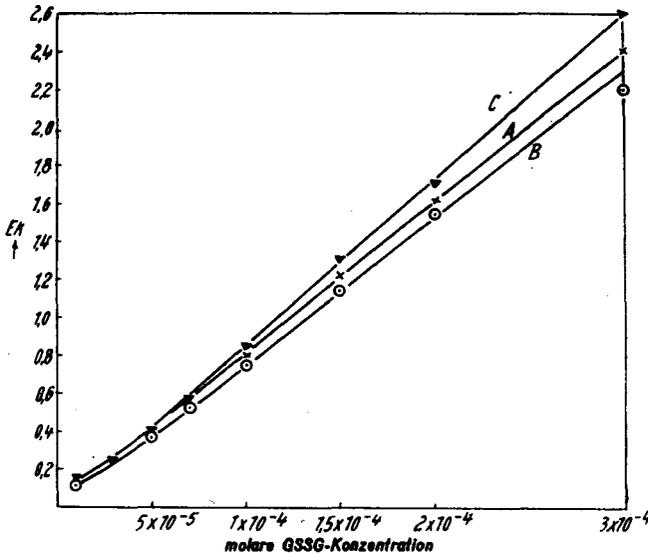
⁴⁾ vergl. A. Schöberl u. F. Ludwig, B. **70**, 1422 [1937].

⁵⁾ B. **71**, 1446 [1938].

⁶⁾ B. **71**, 1623 [1938].

⁷⁾ A. Schöberl u. P. Rambacher, Biochem. Ztschr. **295**, 377 [1938]. Hier sind alle wesentlichen Gesichtspunkte der Methode diskutiert.

nicht aber für SH-Glutathion einfach übertragbar war. Diese Methode setzt bei der Erfassung eines Disulfides eine glatte Umsetzung mit Sulfrit voraus. Auch SS-Glutathion reagiert genügend rasch in einem Acetat-Puffer vom p_H 5.2 mit Natriumsulfrit nach Gleichung 1: $GSSG + Na_2SO_3 = GSNa + GSSO_3Na$ (1). Das so in einer Ausbeute von 50% entstehende SH-Glutathion kann dann von Phosphorwolframsäure oxydiert werden. Auch andere Cystinderivate verhalten sich in dieser Beziehung wie Cystin⁸⁾. Es sind aber auch eine ganze Reihe von Disulfiden bekannt, die unter den gewählten Bedingungen von Sulfrit überhaupt nicht oder nur sehr langsam disproportioniert werden⁹⁾.



Abbild. 1. Eichkurven für die Bestimmung von SS-Glutathion mit 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure.

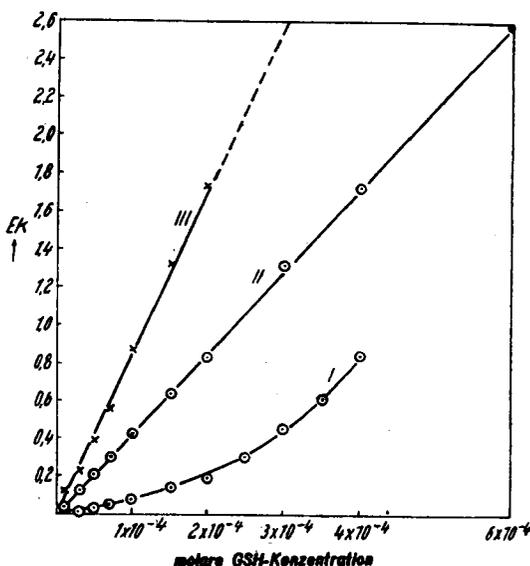
Die mit SS-Glutathion erzielbare Farbintensität entspricht völlig den Erfahrungen bei Cystin (Abbild. 1). Da die SS-Gruppen in Cystin und SS-Glutathion der Phosphorwolframsäure gegenüber das gleiche Reduktionsäquivalent besitzen, besteht durch einfache Vergleichsmessungen die Möglichkeit der Reinheitsbestimmung von SS-Glutathionpräparaten. Wegen der Schwierigkeit der Reindarstellung dieses Disulfides und seiner Empfindlichkeit gegenüber Einflüssen der verschiedensten Art erscheint dies für manche Probleme von Bedeutung. Zudem handelt es sich um eine empfindliche Mikromethode, die die Erfassung von etwa 30 γ in einem Ansatz von 5 ccm noch gestattet.

Bei dem Versuch zur Bestimmung von SH-Glutathion mit Phosphorwolframsäure trat uns zum ersten Male der maßgebende Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration entgegen. Es zeigte sich nämlich überraschenderweise, daß SH-Glutathion bei einem p_H von 5.2 die Phosphorwolframsäure

⁸⁾ A. Schöberl u. Th. Hornung, A. 534, 210 [1938].

⁹⁾ A. Schöberl, B. 70, 1186 [1937]; Schöberl u. Ludwig, l. c.

längst nicht so stark wie Cystein reduzieren kann (Abbild. 2, Kurve I), daß also beide SH-Verbindungen unter den gewählten Bedingungen nicht das gleiche Reduktionsäquivalent besitzen. Außerdem war keine Proportionalität zwischen Farbintensität und Substratkonzentration festzustellen. Es zeigte sich vielmehr, daß bei höheren Konzentrationen die Phosphorwolframsäure stärker reduziert wird. Diese Situation ändert sich aber sofort beim Arbeiten in Bicarbonatlösung¹⁰⁾. Damit war erwiesen, daß für die Bestimmung von SH-Glutathion ein höheres p_H erforderlich ist. Wie aus der in Bicarbonatlösung ermittelten Eichkurve (Abbild. 2, Kurve II) hervorgeht, kann SH-Glutathion bei einem p_H von 7.3 die Phosphorwolframsäure in gleichem Umfang reduzieren wie Cystein bei p_H 5.2. Bei guter Reproduzierbarkeit herrscht strenge Gültigkeit des Beerschen Gesetzes, so daß nunmehr auch für die Bestimmung von SH-Glutathion mit Phosphorwolframsäure eine zuverlässige Ausführungsform vorliegt. Es konnten noch 15 γ SH-Glutathion in einem Ansatz von 5 ccm vermessen werden. Außerdem hat man in der Verdoppelung der Farbintensitäten durch Sulfitzusatz eine einfache Kontrolle zur Verfügung. SH-Glutathion liefert bei Anwesenheit von Natriumsulfit doppelt so hohe Extinktionskoeffizienten wie ohne Sulfit und erzeugt die gleiche Farbintensität wie gleichmolare Konzentrationen an SS-Glutathion. Merkwürdig ist hierbei nur, daß die Bestimmung wiederum im Acetat-Puffer vom p_H 5.2 vorgenommen werden kann (Abbild. 2, Kurve III). Allerdings verschiebt der Sulfitzusatz das p_H etwas nach der alkalischen Seite (etwa p_H 5.6).



Abbild. 2. Eichkurven für die Bestimmung von SH-Glutathion mit 9(18)-Wolframsäure-phosphorsäure.

- I: In Acetat-Puffer (p_H 5.2)
- II: In Bicarbonat
- III: Mit Sulfitzusatz in Acetat-Puffer (p_H 5.2).

Die nicht richtig gewählte H-Ionen-Konzentration bietet sicher auch die Erklärung für die kürzlich mitgeteilten, bisher noch nicht exakt deutbaren Unterschiede zwischen den jodometrischen und colorimetrischen Bestimmungen verschiedener Cysteinderivate⁸⁾. Bei Diformyl-, Dibrompropionyl-, Dialanyl-, Dichloracetyl- und Diglycyl-cystein ergab die Bestimmung mit Phosphorwolframsäure erheblich geringere Werte. Dies erscheint jetzt verständlich. Man hätte auch hier die Vermessung in Bicarbonatlösung vor-

¹⁰⁾ Thiohydracrylsäure verhält sich analog.

nehmen müssen. Im übrigen läßt diese Sachlage darauf schließen, daß bei der in jener Arbeit studierten Einwirkung von NaOH auf Cystinderivate keine nennenswerte Freilegung von Cystin aus den Peptiden erfolgte.

Gleichzeitig mit uns haben sich auch K. Shinohara und K. E. Padis¹¹⁾ um die Anwendung der Phosphorwolframsäure-Methode zur Bestimmung von SH-Glutathion bemüht. Obwohl auch ihnen die Unterschiede im Verhalten von SH-Glutathion und Cystein auffielen, fanden sie den Einfluß der H-Ionen-Konzentration nicht und gelangten daher zu keinem Erfolg. Schon früher wiesen J. W. H. Lugg¹²⁾ und K. Shinohara¹³⁾ auf die Wichtigkeit des geeigneten p_H für den Fall des Cysteins hin; es darf jedoch, wie noch ausführlich gezeigt wird, keinesfalls das Ergebnis an einer SH-Verbindung auf ein anderes System ohne Nachprüfung übernommen werden. Wenn gelegentlich auch von anderer Seite für gewisse zellphysiologische Fragestellungen der Versuch zur Bestimmung von Glutathion an Gewebsauszügen und dergl. mit Phosphorwolframsäure gemacht wurde¹⁴⁾, so muß demgegenüber betont werden, daß jetzt erst die Besonderheiten der Methodik klar erkennbar sind, was allein die Erzielung einwandfreier Werte garantiert. Dies gilt vor allem hinsichtlich der Bestimmung von SH- und SS-Glutathion nebeneinander. Dabei ist es natürlich falsch, wie dies Borger und Mitarbeiter taten, wenn man die SS-Glutathionmengen aus einer Eichkurve abliest, die mit SH-Glutathion aufgenommen wurde.

Wegen des Zusammenhanges des Glutathionvorkommens in der Natur mit wichtigen Stoffwechselfvorgängen ist eine spezifische Bestimmungsmethode für Thiole und Disulfide von hoher Bedeutung. In dieser Beziehung kann die Phosphorwolframsäure-Methode besonders aus zwei Gründen gute Dienste leisten. Einmal gelingt es mit ihrer Hilfe, wenn man unter Zusatz von $HgCl_2$ arbeitet¹⁵⁾, SH-Verbindungen und Disulfide neben anderen reduzierenden Substanzen zu ermitteln. Vor allem aber läßt sich damit Cystein neben SH-Glutathion quantitativ bestimmen. Man wird jetzt auch der interessanten Ansicht nachgehen können, wonach SH-Glutathion in Geweben eine „inaktive Speichersubstanz von SH-Körpern“ darstellen soll, aus der die Zelle im Bedarfsfall das aktivere Cystein entstehen läßt¹⁶⁾.

Der Unterschied im Verhalten von Cystein und SH-Glutathion war die Veranlassung zu einem systematischen Studium der p_H -Abhängigkeit der Reduktionskraft verschiedener SH-Verbindungen gegenüber Phosphorwolframsäure. Die Ergebnisse waren überraschend. Es wurden zu diesem Zweck bei verschiedenem p_H für jedes einzelne System die erzielbaren Farbintensitäten im Photometer gemessen. In Abbild. 3 sind die gefundenen Extinktionskoeffizienten gegen das p_H aufgetragen. Die nahe verwandten Thiol-carbonsäuren sind in ihrer p_H -Abhängigkeit recht verschieden. Der entstandene Kurventyp ist aber, wie die fast parallele Verlagerung der Kurven zeigt, der gleiche. Der Anstieg zu der maximalen Farbintensität erfolgt fast sprunghaft innerhalb eines sehr engen p_H -Bereiches. Für exakte Bestimmungen wird es vorher immer nötig sein, solche p_H -Kurven festzulegen. Zunächst

¹¹⁾ Journ. biol. Chem. **112**, 697 [1936]. ¹²⁾ Biochem. Journ. **26**, 2144 [1932].

¹³⁾ Journ. biol. Chem. **109**, 665 [1935].

¹⁴⁾ vergl. G. Borger, T. Peters u. M. Kurz, Ztschr. physiol. Chem. **217**, 255 [1933]; E. Pfankuch, Biochem. Ztschr. **279**, 115 [1935]; A. Langou u. A. D. Marenzi, C. **1936** II, 2158; F. Bezançon, A. Jacquelin, F. Joly u. Ch.-O. Guillaumin, C. **1937** II, 4347.

¹⁵⁾ Lugg, Biochem. Journ. **26**, 2160 [1932]; Shinohara, Journ. biol. Chem. **111**, 435 [1935]; **112**, 671 [1935].

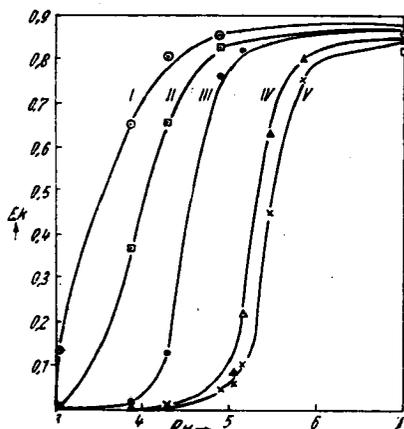
¹⁶⁾ R. Bierich u. A. Rosenbohm, Ztschr. physiol. Chem. **231**, 39 [1935].

kann man erkennen, daß Isocystein und Thioglykolsäure schon bei einem p_H von 5 die Phosphorwolframsäure vollständig reduzieren und auch schon bei p_H 4 hohe Extinktionskoeffizienten liefern. Für Cystein liegt das maximale p_H etwas über 5. Thiohydracrylsäure und SH-Glutathion können schließlich erst von p_H 6 ab ihre volle Reduktionskraft entfalten. Man erkennt aus Abbild. 3 ohne weiteres, daß bei einem p_H von etwa 5 die Phosphorwolframsäure wohl von Cystein maximal, von SH-Glutathion aber nur sehr wenig reduziert wird. Ist mit einem Thiol einmal das Maximum der Farbstärke erreicht, so ändert daran auch das Fortschreiten mit dem p_H in alkalisches Milieu nichts Wesentliches mehr (Tafel 4). Geringe Erhöhungen der Extinktionskoeffizienten mögen auf Nebenreaktionen durch das Oxydationsmittel oder auf die Instabilität des entstehenden Disulfides in der alkalischen Lösung zurückzuführen sein. Wichtig ist in jedem Fall die sprunghafte Änderung der Reduktionsfähigkeit mit der Erhöhung des p_H .

Was den Zusammenhang zwischen p_H -Abhängigkeit und Struktur anlangt, so tritt hier eine interessante Gesetzmäßigkeit zutage. α -Thiol-carbonsäuren sprechen nämlich bereits bei einem geringeren p_H an als β -Thiol-carbonsäuren. Letztere stellen also bei einem bestimmten p_H unterhalb ihres jeweiligen Maximalwertes schwächere Reduktionsmittel dar. Der Einfluß der Stellung der SH-Gruppe kommt in dem Beispiel Cystein-Isocystein besonders klar zum Ausdruck. Die Isocystein-Kurve liegt ganz auf der sauren Seite. Es erscheint also möglich, diese p_H -Abhängigkeit gelegentlich zur Ermittlung der Stellung von SH-Gruppen in unbekanntem Thiolen heranzuziehen.

Es ist nicht gleichgültig, in welchem Puffer die p_H -Abhängigkeit untersucht wird. Wir fanden, daß ein Phosphat-Puffer mit einem p_H von etwa 5.9 viel geringere Farbtintensitäten mit SH-Glutathion und Thiohydracrylsäure, also β -Thiol-carbonsäuren, liefert als ein Acetat-Puffer vom gleichen p_H (Tafel 5). Auffällig ist, daß bei den α -Thiol-carbonsäuren dieser Einfluß nicht zu beobachten war. Es wird doch wohl so sein, daß die Phosphationen des Puffers den für die Reduzierbarkeit maßgebenden Komplex der Heteropolysäure durch Verschiebung der Dissoziationsverhältnisse stören können.

Die enge Beziehung zwischen der Reduktion der komplexen Säure und dem p_H legt die Deutung nahe, daß an dem Reduktionsvorgang die ionisierte Thiolgruppe beteiligt ist. Jedoch stößt die einheitliche Wertung der Dissoziationskonstanten der hier vermessenen SH-Verbindungen in dieser Richtung

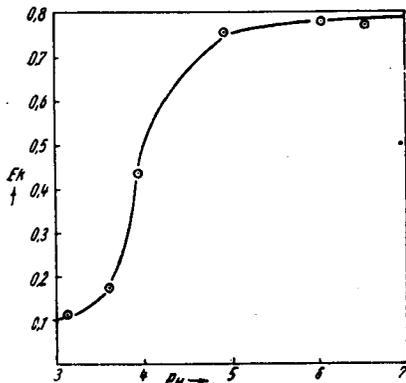


Abbild. 3. p_H -Abhängigkeit der RSH-Bestimmungen.

- I: Isocystein
- II: Thioglykolsäure
- III: Cystein
- IV: Thiohydracrylsäure
- V: SH-Glutathion

noch auf Schwierigkeiten¹⁷⁾. Betont sei nur, daß im SH-Glutathion die SH-Gruppe stärker sauer ist als in der Thioglykolsäure und im Cystein.

Im Rahmen des Gesamtproblems war auch die Frage der p_H -Abhängigkeit der Sulfiteinwirkung auf SS-Bindungen von Interesse¹⁸⁾. Zunächst wurden Versuche am SS-Glutathion vorgenommen. Den Einfluß des p_H haben hier an anderen Systemen Lugg¹²⁾ und später Micheel und Bode¹⁹⁾ festgestellt. Es fehlte bisher aber eine quantitative Aufarbeitung solcher Spaltungsversuche. Vor allem mußte man zur Aufstellung einer Gesamtbilanz neben der entstehenden SH-Verbindung auch das nicht umgesetzte Disulfid ermitteln. Man ließ bei einem bestimmten p_H Sulfit auf SS-Glutathion einwirken und bestimmte dann erst nach völliger Entfernung des Sulfits SH- und SS-Verbindung (Abbild. 4 und Tafel 6). Es ergab sich auch hier



Abbild. 4. p_H -Abhängigkeit der Aufspaltung von SS-Glutathion durch Sulfit.

ein sehr starker Einfluß des p_H . Etwa zwischen dem p_H 3.5 und 5.0 erfolgt ein sehr steiler Anstieg der Ausbeute an SH-Verbindung bis zur maximal möglichen Höhe. Hiermit dürfte auch für die Disproportionierung einer SS-Bindung durch Sulfit die Wichtigkeit der Wahl einer maximalen H-Ionen-Konzentration erwiesen sein.

Hierbei werden ebenfalls von System zu System Unterschiede vorkommen. Dithiodiglykolsäure z. B. wird erst bei p_H 8.37 von Sulfit merklich gespalten (Tafel 8). Ob Natriumacetat diese Disproportionierung wirklich katalysieren kann, muß erst durch eine größere Versuchsreihe bewiesen

werden. Unter diesen Umständen ist auch verständlich, daß Dithiodiglykolsäure in Acetat-Puffer vom p_H 5.2 mit Phosphorwolframsäure nicht colorimetrisch bestimmbar ist (Tafel 7). Dagegen kann man sie sehr wohl bei einem höheren p_H vermessen. Zweckmäßig ist das Arbeiten in Bicarbonatlösung (Tafel 7). Dithiodilactylsäure schließlich wird bis p_H 12 von Sulfit überhaupt nicht angegriffen, ist also merkwürdig stabil. Auch ihre colorimetrische Bestimmung mit Phosphorwolframsäure zeigte die hohe Festigkeit der SS-Bindung. Diese ließ sich nicht einmal bei p_H 13 selbst bei langen Reaktionszeiten einwandfrei durchführen. Erst Erhöhung der Reaktionstemperatur glich die Farbintensitäten den zu erwartenden an (Tafel 9). Hierbei besteht allerdings die Gefahr einer hydrolytischen Aufspaltung der SS-Bindung.

Aus den Darlegungen ist zu erkennen, wie sich nahe verwandte Thiole und Disulfide durch feine Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit ihrer funk-

¹⁷⁾ E. Larsson, Ztschr. anorgan. allem. Chem. **172**, 375 [1928]; R. K. Cannan, u. B. C. J. G. Knight, Biochem. Journ. **21**, 1384 [1927]; H. Borsook, E. L. Ellis u. H. M. Huffman, Journ. biol. Chem. **117**, 281 [1937]; N. W. Pirie u. K. G. Pinhey, Journ. biol. Chem. **84**, 321 [1929].

¹⁸⁾ Daß Disulfide mit verschiedener Geschwindigkeit bei gleichem p_H mit Sulfit reagieren können, ist früher schon mitgeteilt worden (Schöberl u. Ludwig, l. c.).

¹⁹⁾ Naturwiss. **26**, 298 [1938].

tionellen Gruppen auszeichnen. Es ist daher nicht verwunderlich, wenn für biochemisch wichtige Naturstoffe mit SH- oder SS-Gruppen hinsichtlich ihrer physiologischen Bedeutung vielgestaltige Möglichkeiten bestehen.

Die Untersuchungen sind mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt worden. Der eine von uns (Krumey) dankt ferner für ein Stipendium der Liebig-Gesellschaft zur Förderung des chemischen Unterrichts.

Beschreibung der Versuche.

Bezüglich der Durchführung der colorimetrischen Messungen mittels des Pulfrichschen Stufenphotometers sei auf eine frühere Mitteilung verwiesen⁷⁾. Aus Zweckmäßigkeitsgründen und um die Anwendbarkeit der Methode für manche biochemische Fragestellungen zu überprüfen, wurde allgemein das Volumen der Reaktionsansätze von 25 ccm auf 5 ccm verringert und mit der Mikroeinrichtung des Photometers gearbeitet. Da zur Füllung der Mikroabsorptionsrohre bei einer Schichtdicke $s = 10, 20$ und 50 mm nur $0.2, 0.4$ und 1.0 ccm Lösung erforderlich sind, lassen sich noch sehr geringe Substratmengen ermitteln. So ließen sich z. B. bei Cystin noch 12γ in den 5 ccm des Ansatzes messen; im Mikrorohr ($s = 50$ mm) waren in diesem Fall nur etwa 2.4γ Cystin vorhanden. Der stets angegebene Extinktionskoeffizient E_k stellt den Mittelwert aus 5 Ablesungen dar (Rotfilter S 72).

I) Bestimmung von Cystin.

Stammlösung war eine 0.001 -m. Lösung von Cystin in 0.2 -n. H_2SO_4 . Ansätze: Substratlösung ($12-360 \gamma$ Cystin) + 1.3 ccm Acetat-Puffer + 0.2 ccm Sulfitlösung. 10 Min. bei 20° stehengelassen. 0.4 ccm 9-Wolframsäurephosphorsäure (WPhS)-Reagens zugegeben und weiter 30 Min. bei 20° reagieren gelassen. Schließlich auf 5 ccm auffüllen. Ergebnisse in Tafel 1.

Tafel 1.

Mol. Konzentration von Cystin	1×10^{-5}	3×10^{-5}	5×10^{-5}	7×10^{-5}	9×10^{-5}	1×10^{-4}	1.5×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}
s	5	2	2	1	1	1	0.5	0.5	0.5
E_k	0.107	0.222	0.388	0.551	0.736	0.802	1.269	1.683	2.265 2.546

Der höhere E_k bei der Konzentration von 3×10^{-4} wurde so gefunden, daß die 1.5 ccm der Substratlösung im Meßkölbchen zunächst völlig zur Trockne eingedunstet wurden. Den Rückstand löste man dann direkt im Acetat-Puffer und verfuhr im übrigen wie oben angegeben.

II) Bestimmung von SS-Glutathion (GSSG).

Es standen drei verschiedene Präparate zur Verfügung, die durch Oxydation von SH-Glutathion mit Hydroperoxyd erhalten waren. Präp. A stellte Dr. H. Schaper und Präp. B die Fa. Hoffmann-La Roche in Berlin nach einer hier entwickelten Vorschrift dar²⁰⁾. Präp. C hatte in freundlicher Weise Hr. N. W. Pirie (Cambridge, Biochemical Laboratory) überlassen.

²⁰⁾ Schöberl u. Hornung, l. c., u. zwar S. 222.

Die Substanzen trocknete man 3 Stdn. in der Trockenpistole im Hochvakuum (Methanol als Heizflüssigkeit). Stammlösung war zumeist eine 0.005-*m.* Lösung in 0.02-*n.* H₂SO₄. Ansätze: Substratlösung (30.6—918 γ GSSG) + 1.3 ccm Acetat-Puffer vom p_H 5.2 + 0.2 ccm Sulfitlösung und 10 Min. bei 20° stehengelassen. Nach Zugabe von 0.4 ccm WPhS-Reagens ließ man weitere 30 Min. bei 20° reagieren. Schließlich wurde auf 5 ccm aufgefüllt. Fig. 1 enthält die Ergebnisse. Der Ansatz mit der höchsten GSSG-Konzentration enthielt 0.3 ccm Sulfitlösung.

Jodometrische Titration von GSSG: 0.5 bzw. 0.25 ccm 0.1-*m.* GSSG-Lösungen (Präp. A) wurden mit 10 ccm *n.*-HCl und 200 mg Zinkstaub versetzt. Nach 40 Min. filtrierte man ab und wusch mit 30 ccm Wasser. Die erste Reduktion erfolgte in der Kälte, die übrigen in der Wärme. Nach dem Erkalten wurde schließlich unter Zusatz von 1 ccm Stärkelösung mit 0.01-*n.* Jod titriert (Beständigkeit der Jodstärkefarbe etwa 2 Min.)²¹⁾. Die Methode ist für exakte Messungen wenig befriedigend:

Tafel 2.

mg GSSG	30.6	15.3	15.3	15.3	30.6 ²²⁾
ccm 0.01- <i>n.</i> Jod . . .	9.27	5.18	4.48	4.66	9.03
% d. Th. an GSH . . .	92.7	103.6	89.6	93.3	90.3

III) Bestimmung von SH-Glutathion (GSH).

GSH stammte von der Fa. Hoffmann-La Roche in Berlin und war im Hochvakuum getrocknet (Feuchtigkeitsgehalt 0.43%). Analyse: Ber. S 10.42, N 13.70. Gef. S 10.43, N 13.65 (Kjeldahl). Als Substratlösung wurden frische 0.01- bzw. 0.005-*m.* Lösungen in 0.2-*n.* H₂SO₄ benutzt.

a) Messung in Acetat-Puffer: Substratlösung (15.3—614 γ GSH) + 1.3 ccm Acetat-Puffer (p_H 5.2) + 0.4 ccm WPhS-Reagens, 30 Min. bei 20° stehengelassen und auf 5 ccm aufgefüllt. Abbild. 2 zeigt die Ablesungen (Kurve I).

b) Messung in Bicarbonatlösung: Substratlösung (15.3—921 γ GSH) + 0.4 ccm WPhS-Reagens + 1.3 ccm gesättigte NaHCO₃-Lösung, 30 Min. bei 20° stehengelassen und auf 5 ccm aufgefüllt. Die Meßkölbchen waren vorher mit CO₂ gefüllt. Das WPhS-Reagens wurde hier vor der Pufferlösung zugesetzt, um die Gefahr der Luftoxydation zu verringern. Ergebnisse in Abbild. 2 (Kurve II). Die Bicarbonatlösung (sie war etwa 10-proz.) besaß ein p_H von 8.2 (bestimmt im Pulfrich-Photometer). Setzte man 1.3 ccm der Bicarbonatlösung 0.4 ccm WPhS-Reagens zu, so wurde das p_H auf 7.3 herabgedrückt.

c) Messung mit Sulfitzusatz: Substratlösung (15.3—307 γ GSH) + 1.3 ccm Acetat-Puffer (p_H 5.2) + 0.2 ccm Sulfitlösung und 10 Min. bei 20° stehengelassen. Nach Zugabe von 0.4 ccm WPhS-Reagens ließ man weitere 30 Min. bei 20° reagieren und füllte dann auf 5 ccm auf. Ergebnisse in Abbild. 2 (Kurve III).

d) Bemerkungen zur jodometrischen Titration von GSH. Bei dieser sehr viel geübten Titration soll nach einer allgemein angenommenen Ansicht ein sog. „Verdünnungsfaktor“ vorhanden sein, worunter man die Zunahme des Jodverbrauches bei Verdünnung der Lösung versteht. Es wird ferner angegeben, daß man diesen Fehler weitgehend durch Zusatz von KJ bei der Titration ausschalten könne²³⁾. Man scheint

²¹⁾ Versuche von Dr. H. Schaper.

²²⁾ Dieses Präparat wurde durch Luftoxydation von GSH erhalten.

²³⁾ vergl. J. Kühnau, Biochem. Ztschr. **230**, 353 [1931]; R. Bierich u. K. Kalle, Ztschr. physiol. Chem. **175**, 115 [1928].

dabei vielfach die Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion nicht zu berücksichtigen²⁴⁾. Jedenfalls erhält man auch ohne KJ-Zusatz vernünftige Werte, so man dies nicht außer acht läßt (Tafel 3 unter A). Bei KJ-Zugabe besteht eine Neigung zu etwas zu hohen Werten (Tafel 3 unter B). Es hängt dies aber sicher mit der sehr starken Steigerung der Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion durch KJ zusammen. Selbstverständlich ist, daß bei der Oxydation jeder SH-Verbindung mit Jod die Möglichkeit der Weiteroxydation über die Disulfidstufe hinaus beachtet werden muß. Die Verdünnung hat hierauf aber beim GSH nur einen sehr untergeordneten Einfluß. — Zur Titration löste man das GSH in Wasser und fügte 10 Tropfen Stärkelösung zu. Das Titrationsvolumen betrug stets 20 ccm (unter B mit 5 ccm einer 1-proz. KJ-Lösung):

Tafel 3.

	A					B		
mg GSH	13.89	5.556	2.778	1.389	0.484	12.11	4.84	2.42
ccm 0.01- bzw. 0.005-n. Jod.	4.45	1.80	0.896	0.445	0.315	7.85	3.20	1.62
GSH gef. in % d. Th.	98.5	99.4	99.1	98.5	93.6	99.6	101.6	102.6
GSH gef. in % d. Th. ohne Korrektur ..	99.6	102.8	105.6	110.0	126.6	—	—	—

IV) p_H -Abhängigkeit der RSH-Bestimmungen.

Äquivalente Mengen an SH-Verbindungen wurden miteinander verglichen. Die Konzentration im Reaktionsansatz betrug 2×10^{-4} -m. Zumeist benutzte man 0.005-m. Stammlösungen in 0.01-n. H_2SO_4 . Wegen der Reinheit der Präparate kann auf die früheren Arbeiten verwiesen werden. Bei den Thioglykol- und Thiohydracrylsäure-Präparaten konnten die jodometrischen Gehaltsbestimmungen nicht zugrunde gelegt werden, da zwischen ihnen und den Bestimmungen mit WPhS Unterschiede vorhanden sind, deren Ursache erst noch aufgeklärt werden muß. Die Einwaage an Substrat wurde hier auf den maximalen Ek von 0.830 berechnet. Isocystein-chlorhydrat stellte man nach einer neuen Methode dar²⁵⁾. Für den p_H -Bereich von 3—6 wurde ein 2-m. Acetat-Puffer benutzt, für p_H 7—8 ein 0.33-m. Phosphat-Puffer und für p_H 8.86 ein m. Borat-Puffer. Da das WPhS-Reagens (p_H 4.29) freie Säure enthält, setzte man zur Kompensation von p_H 4.5 ab den Pufferlösungen kleine Mengen 5-n. NaOH zu. Der Zusatz des Reagens bewirkte dann nur noch eine sehr geringe Herabsetzung des p_H . Auf 6.5 ccm der entsprechenden Pufferlösung trafen 2 ccm WPhS-Reagens. Das p_H dieses Gemisches, welches man am Stufenphotometer genau festlegte, lieferte die H-Ionen-Konzentration der einzelnen Versuchsansätze. Der Phosphat-Puffer von p_H 8.0 und der Borat-Puffer von p_H 9.0 geben mit dem WPhS-Reagens einen weißen Niederschlag, von dem vor der Messung abzentrifugiert werden mußte. — Ansätze: Substratlösung + 1.3 ccm Pufferlösung + 0.4 ccm WPhS-Reagens (oder umgekehrte Reihenfolge) und 30 Min. bei 20° stehen gelassen. Dann auf 5 ccm mit Wasser aufgefüllt und sofort gemessen (s richtet sich nach der Farbstärke). Von p_H 4.3 ab, besonders aber auf der alkalischen

²⁴⁾ vergl. Kolthoff, Maßanalyse, II. Teil (2. Aufl.), S. 337.

²⁵⁾ Unveröffentlichte Versuche von cand. chem. H. Braun im hiesigen Institut. Über die interessante Substanz wird in Kürze berichtet.

Seite, war es wegen der Gefahr der Luftoxydation nötig, erst das WPhS-Reagens und dann die Pufferlösung (diese möglichst rasch) zuzusetzen. Der Ek wurde sonst leicht zu niedrig gefunden. Für p_H 3.04 bis 7.02 finden sich die Ergebnisse in Abbild. 3, von p_H 7.02 bis 8.86 in Tafel 4:

Tafel 4.

Substrat	Isocystein			Thioglykolsäure			Cystein		
p_H	7.02	8.0	8.86	7.02	8.0	8.86	7.02	8.0	8.86
Ek	0.863	0.898	0.879	0.812	0.776	0.784	0.836	0.832	0.862

Substrat	Thiohydracrylsäure			SH-Glutathion		
p_H	7.02	8.0	8.86	7.02	8.0	8.86
Ek	0.819	0.830	0.787	0.821	0.842	0.868

Die in Tafel 4 unter 0.8 liegenden Werte von Ek für Thioglykolsäure und Thiohydracrylsäure sind sicher auf Luftoxydation zurückzuführen.

Der Einfluß der Pufferart auf die Farbstärke ist in Tafel 5 angegeben (Substrat-Konzentration $2 \times 10^{-4} m.$):

Tafel 5.

Substrat	SH-Glutathion	Thiohydracrylsäure	Isocystein	Cystein	Thioglykolsäure
Ek in Acetat-Puffer p_H 5.85....	0.757	0.796	0.833	0.835	0.824
Ek in Phosphat-Puffer p_H 5.94 .	0.176	0.115	0.840	0.821	0.824

V) p_H -Abhängigkeit der Aufspaltung von SS-Bindungen durch Sulfit.

a) SS-Glutathion: In einem 10-ccm-Meßkölbchen wurde 1 ccm einer 20-proz. Sulfitlösung mit der für ein bestimmtes p_H nötigen Menge n -HCl versetzt und das Volumen mit Wasser auf 7 ccm ergänzt. Das p_H , welches in Parallelansätzen photometrisch ermittelt wurde, lag zwischen 3.12 und 6.56. Dann fügte man 1 ccm einer 0.005- $m.$ GSSG-Lösung in 0.02- $n.$ H_2SO_4 zu (Präp. B) und ließ 10 Min. bei 20° stehen. Nach dieser Zeit füllte man mit n -HCl bis zur Marke auf und schüttelte gut durch. Von dieser Lösung benutzte man jeweils 2 ccm für die GSH- und GSSG-Bestimmung. — Bestimmung von GSH: Die 2 ccm Substratlösung dampfte man bei 40° im Vak. zur Trockne ein (völlige Entfernung von SO_2 nötig!). Dann wurden 0.4 ccm WPhS-Reagens und 1.3 ccm Natrium-bicarbonat-Lösung zugegeben. Man ließ 30 Min. bei 20° stehen, füllte auf 5 ccm auf und bestimmte Ek wie üblich. Ergebnisse in Tafel 6 (vergl. auch Abbild. 4). Bestimmung von GSH + GSSG: Die 2 ccm Substratlösung wurden wiederum bei 40° im Vak. zur Trockne eingedampft. Dann fügte man 1.3 ccm Acetat-Puffer (p_H 5.2) und 0.2 ccm Sulfitlösung zu, ließ 10 Min. bei 20° stehen, versetzte weiter mit 0.4 ccm WPhS-Reagens und ließ weitere 30 Min. bei 20° reagieren. Schließlich wurde auf 5 ccm aufgefüllt. Ergebnisse in Tafel 6²⁶⁾:

²⁶⁾ Für die Berechnung ist zu beachten, daß äquimolekulare Mengen an GSH und GSSG mit Sulfit die gleiche Farbstärke hervorrufen, und daß Sulfit die mit GSH allein erzielbare Farbstärke verdoppelt.

Tafel 7. Methyl-cyclohexyl-chlormethan.

SnCl ₄ : 0.12 Mol in Benzol (T = 25°). 0.8822 g (—) - Methyl - cyclohexyl - chlor - methan, 0.188 g SnCl ₄ in Benzol zu 15 ccm gelöst.	Min.	Drehung	k
	0	—1.66	
	15	—1.58	0.00329
	30	—1.51	0.00313
	60	—1.38	0.00312
	90	—1.25	0.00308
	180	—0.92	0.00328

391. Fr. Hein und Alex. Klein: Eine verbesserte Darstellung von Triäthylblei und Trimethylblei*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]
(Eingegangen am 19. Oktober 1938.)

Untersuchungen über die Reaktionen der Blei-Organoverbindungen führten uns dazu, die Darstellung des Triäthylbleis erneut zu bearbeiten und dabei erheblich zu verbessern. Diese Substanz entsteht nach C. Löwig¹⁾ bei der Einwirkung von Halogenäthyl auf Blei-Natrium-Legierungen passender Zusammensetzung unter geeigneten Bedingungen; sie ist dann aber immer mehr oder weniger vermengt mit Tetraäthylblei²⁾. Weit reinere Produkte lieferte nach Beobachtungen E. Krauses³⁾ die Umsetzung von Äthylmagnesiumhaloid mit Bleichlorid. Ein spezielleres Verfahren schilderten T. Midgley⁴⁾, C. A. Hochwalt u. G. Calingaert. Sie gingen aus von Triäthylbleihydroxyd und elektrolysierten die alkoholische Lösung an Blei-Elektroden. Bezeichnenderweise unterließen sie aber jegliche Ausbeuten-Angabe. Bei der Nacharbeitung konnten wir dementsprechend trotz peinlicher Einhaltung der angegebenen Bedingungen das Triäthylblei nur in schlechter Ausbeute erhalten. Die Ursache sehen wir in der Alkohol-Löslichkeit des Triäthylbleis, das aus diesem Grunde gleich nach der Entstehung vom Elektrolyten aufgenommen wird und so in die Oxydationszone der Anode gerät.

Es gelang uns nun, die Elektrolyse wesentlich zu vervollkommen, als wir ein Diaphragma benutzten und auf den Alkohol als Lösungsmittel verzichteten, statt dessen aber nach Feststellung der guten Wasserlöslichkeit des Triäthylbleihydroxyds wäßrige, aber alkalihaltige Lösungen verwandten. Auf diese Weise waren leicht Ausbeuten von 80—90% zu erreichen und gleichzeitig wurde die Aufarbeitung sehr vereinfacht; das in Wasser unlösliche und spezifisch schwere Bleitriäthyl tropfte nämlich glatt von der Elektrode ab und brauchte am Ende nur abgelassen und mit Natriumsulfat getrocknet zu werden. Die umständliche Trennung vom Lösungsmittel war also auch nicht mehr nötig. Schließlich erkannten wir, daß es nicht einmal erforderlich war, das Triäthylbleihydroxyd in Substanz zu isolieren. Es genügte vollkommen, die Auflösung des Ausgangsmaterials, des Triäthylbleichlorids, in der eben zureichenden Menge 2-n. wäßriger Alkalilauge als Elektrolyt zu verwenden.

*) Diese Mitteilung bildet einen Teil des am 10. Okt. 1938 von Fr. Hein vor der Deutschen Chem. Gesellschaft zu Berlin gehaltenen Vortrags über Reaktionen von bleiorganischen Verbindungen. ¹⁾ A. 88, 318 [1853].

²⁾ A. Ghira, Gazz. chim. Ital. 24, I, 42 [1894].

³⁾ vergl. E. Krause u. A. v. Grosse, „Chemie d. metallorganischen Verbindungen“, S. 374.

⁴⁾ T. Midgley jr. etc., Journ. Amer. chem. Soc. 45, 1821 [1923].