

72. Richard Kuhn, Leonhard Birkofer und Forrest Ward Quackenbush: Jodometrische Titration von SH-Gruppen; Mikromethode zur Bestimmung von Cystein und Methionin in Proteinen.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 18. Januar 1939.)

Die von A. Kekulé und E. Linnemann¹⁾ entdeckte Bildung von Disulfiden aus Mercaptanen (Mercaptiden) und Jod haben schon viele Forscher²⁾ zu einer quantitativen titrimetrischen Bestimmung von SH-Gruppen heranzuziehen versucht. Insbesondere für die Bestimmung von Cystein und von SH-Glutathion in wäßrigen Lösungen ist dieses Verfahren wiederholt angewandt worden, obwohl die Reaktion nicht stöchiometrisch verläuft und besondere, empirisch ermittelte „Verdünnungsfaktoren“ der Berechnung der Ergebnisse zugrundegelegt werden mußten. Die Abweichungen von der Theorie kommen dadurch zustande, daß bei der Einwirkung von Jod auf die Sulfhydrylverbindungen nicht nur die Disulfide, sondern auch Sulfensäuren, Sulfinsäuren und Sulfonsäuren gebildet werden³⁾. Der Jodverbrauch ist stets viel zu hoch und das Ergebnis von den Versuchsbedingungen stark abhängig. Verbessert wurde das Verfahren durch T. F. Lavine⁴⁾, der die Titration unter Stickstoff in 0.5- bis 1.5-n. Jodwasserstoffsäure sehr langsam ausführt. Man hat auch schon in nicht wäßrigen Lösungen, z. B. in Isoamylalkohol⁵⁾ gearbeitet; auch unter diesen Bedingungen ging die Oxydation über die Stufe des Disulfids hinaus⁶⁾.

Wir haben nun gefunden, daß man in *Eisessig* die Dehydrierung von Sulfhydrylverbindungen zu Disulfiden durch Jod genau stöchiometrisch, rasch und auch mit sehr geringen Substanzmengen ausführen kann, ohne daß es nötig ist, den Sauerstoff der Luft auszuschließen. Aus Abbild. 1 ist der Einfluß der Essigsäure-Konzentration auf die jodometrische Bestimmung von Thiomilchsäure, SH-Glutathion und Cystein ersichtlich. Man erkennt, daß schon in 70-proz. Essigsäure die theoretischen Werte praktisch erreicht werden. Für die Bestimmung von Cystein in Eiweißhydrolysaten ist dies von Wichtigkeit, weil sich die bei der Hydrolyse entstehenden Gemische von Aminosäuren in reinem Eisessig meist nicht, in wasserhaltiger Essigsäure dagegen ohne Ausnahme gut lösen. Aus diesem Grunde verwenden wir als Lösungsmittel 90-proz. Essigsäure.

Man läßt z. B. 0.2—0.5 mg Cystein-chlorhydrat mit mindestens dem doppelten der erforderlichen Jodmenge 1 Min. bei etwa 20° stehen, verdünnt

1) A. **123**, 277 [1862].

2) Y. Okuda, Journ. Biochemistry **5**, 217 [1925] (C. **1926** I, 1462); H. D. Baernstein, Journ. biol. Chem. **115**, 25 [1936]; K. H. Slotta u. W. Forster, B. **71**, 1082 [1938]; A. Schöberl u. F. Krumey, B. **71**, 2361 [1938]; B. Kassell u. E. Brand, Journ. biol. Chem. **125**, 145 [1938] u. a. m.

3) K. Shinohara, Journ. biol. Chem. **97**, XXII [1932]; D. G. Simonsen, Journ. biol. Chem. **101**, 35 [1933]; G. Toennis, Journ. biol. Chem. **122**, 27 [1937].

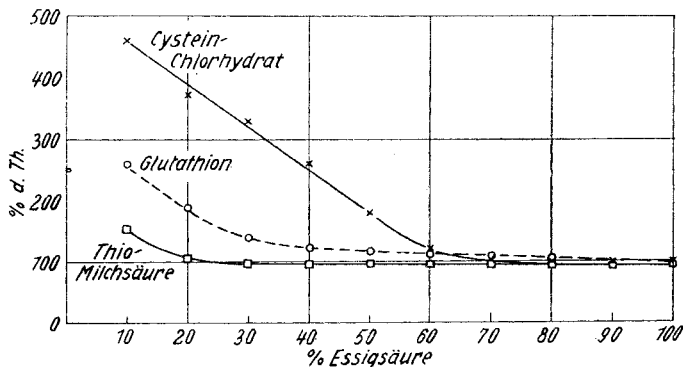
4) Journ. biol. Chem. **109**, 141 [1935]; s. a. B. Kassell u. E. Brand, Journ. biol. Chem. **125**, 145 [1938].

5) G. Toennis, Journ. biol. Chem. **122**, 27 [1937].

6) Für weitere Methoden zur Bestimmung von SH-Gruppen sei auf die zusammenfassende Darstellung von K. Shinohara, Journ. biol. Chem. **109**, 665 [1935] verwiesen. S. a. R. Kuhn u. P. Desnuelle, Ztschr. physiol. Chem. **251**, 14 [1938].

mit dem gleichen Volumen Wasser und titriert mit $n/250$ -Natriumthiosulfat zurück. Man kann das Jod in 90-proz. Essigsäure auch 10 Min. einwirken lassen: es ändert sich an dem Ergebnis nichts.

Liegt Cystin vor, so muß erst eine Reduktion zu Cystein ausgeführt werden. Zu diesem Zwecke haben wir im Bereich unserer Mikroversuche Zn, Mg, H_2S , SO_2 , KCN und KH_2PO_4 angewandt. Die Reduktionswirkung des Zinks⁷⁾ ist eine gute, aber leider wird die jodometrische Bestimmung durch Zinksalze, wie Tafel 4, zeigt, gestört. Auch andere Metallsalze stören.



Abbild. 1. Jodometrische Titration von SH-Gruppen in Lösungen von steigendem Essigsäure-Gehalt.

Am besten bewährt hat sich das von H. D. Baernstein²⁾ empfohlene Kaliumhypophosphit. Gegen geringe Mengen von Phosphoniumjodid bzw. Phosphorwasserstoff, die bei dem Verfahren von H. D. Baernstein nicht stören, ist jedoch die Mikromethode recht empfindlich. Es ist notwendig, durch wiederholtes Abdampfen des Protein-Hydrolysats mit Wasser bis zur Trockne diese Zersetzungsprodukte des Hypophosphits restlos zu beseitigen. Schließlich ist es erforderlich, durch Verdampfen mit 30-proz. Essigsäure auch noch dafür zu sorgen, daß das aus dem Methionin des Proteins entstandene Thiolacton als solches erhalten bleibt und nicht ganz oder teilweise in Homocystein übergeht.

Unter Berücksichtigung all dieser Umstände gelingt es, mit großer Genauigkeit mikro-analytisch in Proteinen Methionin und Cystein zu bestimmen. Die für Casein, Ovalbumin, Globin, Insulin, Vitellin und Phalloidin gefundenen Werte sind aus Tafel 1 ersichtlich. Man erkennt, daß die Summe des als Methionin, als H_2S und als Cystin gefundenen Schwefels mit dem als $BaSO_4$ bestimmten Gesamt-S vorzüglich übereinstimmt. Die Aufstellung von S-Bilanzen, gegen die neuerdings verschiedene Bedenken erhoben worden sind⁸⁾, erscheint uns nicht nur als gerechtfertigt, sondern als wichtige Aufgabe der Protein-Chemie.

Aneurin (Vitamin B_1) und Lactoflavin (Vitamin B_2) geben bekanntlich beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure unter den Bedingungen der Methyl-

⁷⁾ vergl. Y. Okuda, Fußn. 2.

⁸⁾ F. Micheel u. G. Bode, B. **71**, 2653 [1938]; F. Micheel, B. **72**, 68 [1939].

imidbestimmung etwas Alkyljodid. Unter unseren Bedingungen erhält man, wie Tafel 6 zeigt, nur Spuren. Diese sind ohne Bedeutung für die Methionin-Werte von Proteinen, an deren Aufbau eines dieser beiden Vitamine beteiligt ist. Auf der Cystein-Seite verursacht Aneurin gar keinen Fehler, Lacto-

Tafel 1. Schwefelbilanzen.

Protein	% S gef. als Methionin	% S gef. als H ₂ S	% S gef. als Cystin	Summe % S ber.	% S gef. als Bariumsulfat
Casein	0.65	0.07	0.13	0.85	0.86
	0.65	0.07	0.11	0.83	
Ovalbumin	1.03	0.07	0.48	1.58	1.59
	1.04	0.06	0.48	1.58	
Globin (Pferd)	0.20	0.02	0.28	0.50	0.49
	0.20	0.02	0.27	0.49	
Globin (Hund)	0.11	0.03	0.42	0.56	0.55
	0.11	0.02	0.43	0.56	
Insulin	0.12	0.18	3.18	3.48	—
	0.12	0.18	3.23	3.53	
Vitellin	0.66	0.05	0.47	1.18	1.20
	0.64	0.05	0.48	1.17	
Phalloidin	0.75	0.11	4.03	4.89	4.62 ⁹⁾

flavin macht eine geringe Korrektur erforderlich. Ohne jede Störung werden sich Proteine analysieren lassen, die als prosthetische Gruppe Adermin (Vitamin B₆), Nicotinsäure-amid oder Astaxanthin enthalten (Tafel 6).

Die unmittelbare Analyse von Hämoglobinen ist kaum durchführbar. Die Bestimmung des Methionins wird zwar durch Hämin nicht gestört, wohl aber diejenige des Cysteins. Das Störende ist weniger das Eisen als vielmehr das Porphyrin, das unter der Einwirkung der Jodwasserstoffsäure ein Gemisch von Pyrrolen liefert, die gegen Jod in Eisessig nicht beständig sind. Der „scheinbare Cystingehalt“ von Hämin beträgt z. B. 22%, von Protoporphyrin-dimethylester 27%, von Bilirubin 16% (Tafel 6). Diese Werte schwanken mit den Versuchsbedingungen merklich, so daß man sie nicht gut als „Korrektur“ benutzen kann. Die erforderliche Korrektur würde 4—5 Atomen S je 1 Mol. Hämoglobin (68000) entsprechen und zu unsicher sein. Aus diesem Grunde sind wir ganz dazu übergegangen, die Hämoglobine nur noch auf indirektem Wege zu analysieren, d. h. Methionin und Cystein in den entsprechenden Globinen zu bestimmen. Dies läßt sich ohne Schwierigkeit sehr genau durchführen und liefert stimmende S-Bilanzen.

Es ist selbstverständlich, daß die auf Methionin zu prüfende Substanz frei von Alkoxy-, Alkylimid- und andersartig an S gebundenen Alkylen sein muß. Bei der Analyse von Agar findet man z. B. 5.7% „Methionin“,

⁹⁾ F. Lynen u. U. Wieland, A. 533, 93 [1937]; Mittelwert von 2 Analysen im Perlenrohr nach Pregl; nach Carius wurde der S-Gehalt niedriger gefunden.

die in Wirklichkeit einem Methoxylgehalt von 0.57% CH_3 entsprechen. Der in Form von Schwefelsäure-estern vorliegende S wird glatt als H_2S abgespalten und titriert. Auch beim Sulfanilamid (Prontosil) findet man den gesamten S (18.6%) als H_2S in der Vorlage, während die im Kolben zurückbleibenden basischen Spaltstücke durch ihren Jodverbrauch überdies noch „Cystein“ vortäuschen (Tafel 6). Bei der Adenyl-thiomethylpentose (Schmp. 212⁰) aus Hefe, R.S.CH_3 , liefert die Spaltung durch HJ nur zu etwa $\frac{2}{3}$ Methyljodid, während zu etwa $\frac{1}{3}$ Methyl-mercaptan entsteht. Die Triacetyl-thiomethylpentose (Schmp. 67—69⁰) verhält sich genau so.

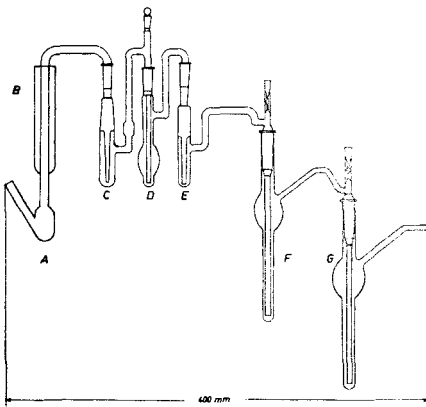
Aus diesen Beispielen ist ersichtlich, daß das vorliegende Verfahren nicht nur zur Bestimmung von Methionin und Cystein in Proteinen geeignet ist. Es gestattet allgemein mit kleinen Substanzmengen Anhaltspunkte über die Bindungsart des Schwefels in Naturprodukten zu gewinnen.

Beschreibung der Versuche.

Apparatur und Ausführung der Bestimmungen.

Die von H. D. Baernstein¹⁰⁾ angegebene Bestimmung der Schwefelverteilung in Proteinen wurde von uns nach einigen Veränderungen in folgende Mikromethodik umgewandelt.

Die Apparatur (Abbild. 2) besteht aus dem Hydrolysegefäß A und aus den sich anschließenden Absorptionsgefäßen. In den Kolben A werden mit



Abbild. 2. Mikro-Apparatur zur Bestimmung der Schwefelverteilung in Proteinen.

Hilfe eines Wägeröhrchens mit langem Stiel 30—60 mg (je nach Schwefelgehalt) des zu hydrolysierenden Proteins gebracht und mit 2 ccm frisch über KH_2PO_4 destillierter Jodwasserstoffsäure (d 1.70) und 3 Tropfen mit KH_2PO_4 gesätt. HJ versetzt. Mit einem Mikrobrenner wird der Kolbeninhalt bis zum Sieden erhitzt und durch die Capillare langsam reiner Stickstoff hindurchgeleitet. Zur gleichmäßigen Erwärmung des aufsteigenden Rohres wird der Mantel B mit 60—70⁰ warmem Wasser gefüllt. Das Absorptionsgefäß C enthält 1 ccm einer wäßrigen 1-proz. Suspension von rotem Phosphor zum Zurückhalten von etwa gebildetem Jod. In das Absorptionsgefäß D wird 1 ccm einer Lösung, die 20% CdCl_2 und 20% BaCl_2 enthält, gebracht, um den als H_2S übergehenden Schwefel zu binden. Geringe Spuren von SO_2 werden durch das BaCl_2 absorbiert. Das Gefäß E enthält 1 ccm gesätt. HgCl_2 -Lösung, um den durch Zersetzung von Hypophosphit auftretenden PH_3 zu absorbieren. Die folgenden 2 Absorptionsgefäße F und G enthalten je 2 ccm Eisessig, in dem 10% Kaliumacetat gelöst sind, sowie je 6 Tropfen Brom (p. a. Merck),

¹⁰⁾ Journ. biol. Chem. **115**, 25 [1936].

um das vom Methionin herrührende CH_3J zu Jodat zu oxydieren. Die ersten 3 Absorptionsgefäße werden in ein auf 50—60° gehaltenes Wasserbad eingetaucht. Wenn das Hydrolysat nach 1 Stde. noch orangerot bleibt und sich nicht aufhellt, muß noch etwas von der mit KH_2PO_2 gesätt. HJ-Lösung zugegeben werden. Die Hydrolyse und Überführung von Methionin in CH_3J wird in 5 Stdn. erzielt. Eine Verkürzung der Reaktionszeit empfiehlt sich nicht, da sonst leicht zu tiefe Methioninwerte gefunden werden. Es ist sehr wichtig, daß die Dichte der HJ nicht geringer ist als 1.70.

Methionin: Der Inhalt der beiden letzten Absorptionsgefäße wird mit 25-proz. Natriumacetat-Lösung auf 25 ccm gebracht, nachdem man das überschüssige Brom mit Ameisensäure (6 Tropfen) entfärbt hat. Ein aliquoter Teil wird mit etwas festem KJ versetzt, angesäuert und mit $n/_{250}$ -Thiosulfat titriert. 1 ccm $n/_{250}$ -Thiosulfat entspricht 0.0992 mg Methionin.

H_2S -Schwefel: In das Gefäß D gibt man $n/_{250}$ -Jod in Eisessig und 0.5 ccm 2-n. HCl. Die Menge der Jodlösung muß so groß sein, daß, wenn alles gelbe CdS verschwunden ist, was ungefähr $\frac{1}{2}$ Stde. dauert, die Lösung noch orange gefärbt bleibt. Der Inhalt des Gefäßes wird mit $n/_{250}$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zurücktitriert. 1 ccm $n/_{250}$ -Jod entspricht 0.064 mg Schwefel.

Cystein: Das fast farblose oder schwach gelblich gefärbte Hydrolysat im Kolben A wird durch Nachspülen mit Eisessig quantitativ in einen 5 ccm-Meßkolben gebracht. Ein aliquoter Teil oder die gesamte Menge wird in ein Rundkölbchen gegeben und im Vak. im Wasserbad zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 0.3 ccm Wasser gelöst. Das aus dem notwendigerweise im Überschuß angewandten Hypophosphit mit HJ gebildete PH_4J wird durch Wasserzusatz zersetzt, wobei der auftretende PH_3 durch den Geruch wahrnehmbar ist. Man gibt jetzt 1 ccm 30-proz. Essigsäure zu und dampft erneut zur Trockne ein. Dies wird so oft wiederholt bis der Geruch nach PH_3 verschwunden ist. Zu dem in 0.3 ccm Wasser gelösten Rückstand gibt man 3 ccm Eisessig (p. a. Merck), mischt gut durch und versetzt mit $n/_{250}$ -Jod in Eisessig. Die Menge der Jodlösung muß mindestens das Doppelte der für die Reaktion notwendigen betragen. Man gibt unter kräftigem Schütteln noch soviel Wasser hinzu, daß eine Gesamtkonzentration von 90% Eisessig vorliegt und läßt 1 Min. stehen. Hierauf wird die Lösung mit Wasser langsam verdünnt, bis die Essigsäurekonzentration nicht mehr als 50% beträgt und mit $n/_{250}$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zurücktitriert. 1 ccm Jodlösung entspricht 0.480 mg Cystin bzw. 0.484 mg Cystein.

Reagenzien: Die Jodwasserstoffsäure (d 1.70, zur Methoxybestimmung nach Zeisel, p. a. E. Merck) wird mit Kaliumhypophosphit¹¹⁾ (E. Merck) (etwa 1 g auf 25 ccm) versetzt und unter Durchleiten von reinstem Stickstoff in einer ganz mit Glasschliffen zusammengesetzten Apparatur destilliert. Etwa 5 ccm sollen im Kolben zurückbleiben¹²⁾. Es kommt darauf an, daß die Dichte der übergegangenen farblosen Jodwasserstoffsäure nicht

¹¹⁾ Man kann auch roten Phosphor verwenden.

¹²⁾ Dampft man zu weit ab, so kann der durch Zersetzung des Hypophosphits entstehende Phosphorwasserstoff sich bei Zutritt von Luft entzünden. Dies erfolgt meist von der Vorlage aus, wobei die Flamme durch den Kühler zurückschlägt und sich in der Apparatur roter Phosphor abscheidet.

unter 1.69 liegt¹³⁾. Werden laufend Bestimmungen ausgeführt, so empfiehlt es sich, das Reagens in Ampullen aus braunem Glas unter Stickstoff einzuschmelzen und im Dunkeln aufzubewahren. Stehen 2 Apparaturen zur Verfügung, so daß man jeden Tag 2 Analysen ausführen kann, so wähle man 5-ccm-Ampullen. Den Vorrat bemesse man für nicht mehr als 1 Woche.

Die KH_2PO_2 -gesättigte Jodwasserstoffsäure stellt man dar durch Eintragen von etwa 0.1 g Kaliumhypophosphit in 10 ccm der käuflichen (*d* 1.70). Man schüttelt durch und läßt stehen. Nach mehreren Minuten ist die Entfärbung vollständig. Dieses Reagens kann auch in einer Flasche aus farblosem Glas im Tageslicht aufbewahrt werden.

Die n_{250} -Jod-Eisessig-Lösung wird aus einer n_{50} -Stammlösung (2.538 g Jod p. a. in 1000 ccm Eisessig p. a.) bereitet, deren Titer über Thio-sulfat genau auf Kaliumbichromat eingestellt ist. Die Haltbarkeit der n_{250} -Lösung ist selbst im Tageslicht ausgezeichnet. Es ist bei Ausführung der Cysteinbestimmungen zu beachten, daß auch Eisessig p. a. von E. Merck geringe Mengen von Jod verbraucht, durchschnittlich 0.01 ccm n_{250} -Jod für 1 ccm. Wir haben uns viel Mühe gegeben diesen Leerwert durch Destillation des Eisessigs über Kaliumpermanganat, Chromsäure u. a. zu beseitigen, ohne zu einem wirklich befriedigenden Ergebnis zu gelangen. Es ist am einfachsten, den Jodverbrauch des jeweils angewandten Eisessigs experimentell zu ermitteln und in Rechnung zu stellen. Da für die einzelne Cysteinbestimmung 3 ccm Eisessig p. a. benötigt werden, beträgt die durchschnittliche Korrektur nur 0.03 ccm n_{250} .

Bei der n_{250} -Natriumthiosulfat-Lösung, die wir von der käuflichen n_1 -Lösung (E. Merck) ausgehend bereiten, ist darauf zu achten, daß zum Verdünnen reinstes, doppelt dest. Wasser verwendet wird. Der Titer nimmt dann im Laufe von 8—14 Tagen um nicht mehr als 2—4% ab.

Das für die Testanalysen verwendete Methionin war ein Präparat von F. Hoffmann-La Roche, das unter 1 mm über P_2O_5 aufbewahrt wurde. In der Makro-Apparatur nach H. D. Baernstein wurde gefunden:

20.1 mg Sbst.: $\frac{1}{4}$ der Vorlage verbr. 9.73 ccm n_{50} - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 19.30 mg Methionin (96.0% d. Th.). — 23.4 mg Sbst.: $\frac{1}{4}$ der Vorlage verbr. 11.60 ccm n_{50} - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 23.01 mg Methionin (98.5% d. Th.).

In der Mikro-Apparatur ergab sich für dasselbe Präparat:

1.961 mg Sbst.: $\frac{1}{5}$ der Vorlage verbr. 1.50 ccm n_{50} - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 1.86 mg Methionin (95.0% d. Th.). — 2.040 mg Sbst.: $\frac{1}{5}$ der Vorlage verbr. 1.55 ccm n_{50} - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 1.92 mg Methionin (94.0% d. Th.).

Das Cysteinchlorhydrat von Schering-Kahlbaum A.-G. (Reagens nach O. Warburg, über P_2O_5 getrocknet) war laut jodometrischer Titration in 90-proz. Essigsäure 97—98-proz.:

2.500, 1.000, 1.166 mg Sbst. verbr. 3.85, 1.55, 1.81 ccm n_{250} -Jod = 97.2, 97.6, 97.8% d. Th.

Tafel 2 gibt die in 70- bis 100-proz. Essigsäure gefundenen Werte für SH-Glutathion und Cystein an, die in Abbild. 1 dargestellt sind, aber aus den Kurven nicht mit genügender Genauigkeit abgelesen werden können.

¹³⁾ Die ersten übergelassenen ccm haben oft eine geringe Dichte.

Das SH-Glutathion (F. Hoffmann-La Roche) erwies sich als 96-proz. (Tafel 2). Es wurde, wie auch alle anderen SH-Verbindungen, unter reinstem Stickstoff (Osram A.-G.) in doppelt dest. Wasser, aus dem durch reinstem Stickstoff die Luft verdrängt worden war, gelöst. Der Eisessig, der zur Verdünnung diente (E. Merck p. a.), war nicht entlüftet.

Tafel 2.

Konzentration der Essigsäure	je 0.792 mg SH-Glutathion			je 0.476 mg Cysteinchlorhydrat		
	ccm <i>n</i> /250	mg gefunden	% d. Th.	ccm <i>n</i> /250	mg gefunden	% d. Th.
70 %	0.70	0.856	108	0.77	0.485	101.8
80 %	0.67	0.820	103.5	0.75	0.473	99.1
90 %	0.62	0.760	96	0.75	0.473	99.1
100 %	0.62	0.760	96	0.75	0.473	99.1

Tafel 3 gibt 2 Beispiele für die gleichzeitige Bestimmung von Methionin und Cystin-dichlorhydrat in Gegenwart von Natriumsulfat.

Tafel 3.

Analyse künstlicher Gemische von Methionin, Cystin und Natriumsulfat.

	mg angewandt	ccm <i>n</i> /250 verbr.	mg gefunden	% d. Th. gefunden
Methionin I	0.853	5×1.66	0.827	96.7
Methionin II	0.853	5×1.65	0.813	95.4
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄) I...	0.470	1.70	0.482	102.5
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄) II...	0.470	1.71	0.485	103.2
Cystin-dichlorhydrat I.....	1.080	5×1.67	1.051	97.2
Cystin-dichlorhydrat II.....	1.080	5×1.68	1.058	98.0

Das Cystin-dichlorhydrat erhielten wir durch Lösen von Cystin (0.5 g) in der berechneten Menge 2-*n*. Salzsäure und Zusatz von 300 ccm Eisessig. Über Nacht krystallisierte das Dichlorhydrat in langen glitzernden Nadeln aus.

3.495 mg Sbst.: 3.210 mg AgCl.

C₆H₁₂O₄N₂S₂, 2 HCl. Ber. Cl 22.68. Gef. Cl 22.72.

Von den zahlreichen, an Cystin ausgeführten Reduktionsversuchen, teilt Tafel 4 diejenigen mit, aus denen der störende Einfluß von Zinkacetat auf die jodometrische Titration hervorgeht.

Die Bestimmungen des Gesamt-S erfolgten im Spiralrohr nach F. Pregl unter Berücksichtigung der zusätzlichen Vorschriften von A. Friedrich¹⁴⁾,

¹⁴⁾ A. Friedrich u. O. Watzlaweck, Ztschr. analyt. Chem. 89, 401 [1932].

deren Befolgung für die Genauigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung ist.

52.77 mg Casein: 3.293 mg BaSO₄. Gef. 0.857 % S. 51.866 mg Ovalbumin: 5.99 mg BaSO₄. Gef. 1.586 % S. 35.870 mg Vitellin: 3.120 mg BaSO₄. Gef. 1.195 % S. 56.370 mg Globin (Hund): 2.250 mg BaSO₄. Gef. 0.548 % S. 30.260 mg Globin (Pferd): 1.060 mg BaSO₄. Gef. 0.481 % S.

Wir verdanken diese Analysen der Freundlichkeit von Frau Dipl.-Ing. Jørgine Sørensen.

Tafel 4.

Einfluß von Zinkacetat auf die Titration von Cystein-chlorhydrat mit Jod in 90-proz. Essigsäure.

Je 1 ccm = 0.575 mg Cysteinchlorhydrat; Gesamtv. = 4.3 ccm 90-proz. Essigsäure.

Nr.	Zinkacetat (mg)	Jodverbrauch ccm n/250	Cystein-HCl (mg gef.)	% d. Th.
1	0	0.91	0.572	99
2	0	0.91	0.572	99
3	10	0.94	0.592	103
4	10	0.95	0.598	104
5	20	1.02	0.643	112
6	20	1.02	0.643	112
7	60	1.07	0.675	118
8	60	1.06	0.667	116
9	150	1.27	0.830	139

Die Belegzahlen für die S-Bilanzen der Tafel 1 finden sich in Tafel 5.

Tafel 5.

Protein	mg	Methionin		H ₂ S-Schwefel		Cystin	
		mg	%	mg	%	mg	%
Casein	53.60	1.612	3.01	0.036	0.068	0.254	0.47
	51.10	1.558	3.05	0.038	0.074	0.202	0.59
Eialbumin	49.70	2.40	4.82	0.033	0.967	0.89	1.79
	47.70	2.32	4.87	0.029	0.061	0.85	1.78
Oxyhämoglobin (Pferd)	49.90	0.468	0.94	0.013	0.027	—	—
	47.30	0.456	0.97	0.012	0.024	—	—
Globin (Pferd)	54.40	0.517	0.95	0.013	0.023	0.570	1.05
	53.64	0.498	0.93	0.010	0.019	0.535	1.00
Oxyhämoglobin (Hund)	53.50	0.268	0.50	0.014	0.026	—	—
	62.90	0.312	0.50	0.018	0.028	—	—
Globin (Hund)	53.82	0.267	0.50	0.016	0.030	0.849	1.58
	54.18	0.265	0.49	0.013	0.024	0.864	1.59
Insulin	41.06	0.226	0.55	0.073	0.178	4.90	11.91
	43.89	0.242	0.55	0.081	0.184	5.30	12.08
Vitellin	38.30	1.19	3.10	0.020	0.051	0.68	1.76
	39.00	1.17	3.00	0.020	0.051	0.70	1.78
Phalloidin	30.30	1.060	3.51	0.034	0.108	0.458	15.10

Das Casein nach Hammarsten (E. Merck) wurde, wie auch alle folgenden Proteine bei 110° über P₂O₅ zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Ovalbumin haben wir aus frischen Hühnereiern nach S. P. L. Sörensen und M. Höyrup¹⁵⁾ dargestellt, 3-mal umkrystallisiert und gegen fließendes dest. Wasser erschöpfend dialysiert, bis die Außenlösung mit Neßlers Reagens und die 5-proz. Innenlösung mit Bariumchlorid keine Reaktion mehr gab.

Die Oxyhämoglobine aus Pferde- und Hundeblood wurden unter Benutzung bekannter Vorschriften wie folgt gewonnen:

Das defibrinierte Blut wurde zentrifugiert, die untere Zellschicht 4- bis 5-mal mit physiologischer Kochsalzlösung an der Zentrifuge gewaschen und anschließend durch Anrühren mit dem doppelten Vol. Wasser hämolysiert. Je 100 ccm der erhaltenen Lösung wurden nach scharfem Zentrifugieren langsam unter Rühren mit 20—25 ccm Alkohol versetzt und in den Eisschrank gestellt. Die Oxyhämoglobin-Krystalle schieden sich gewöhnlich innerhalb einiger Stunden aus. Die Mutterlauge wurde durch Zentrifugieren entfernt und die Krystallmasse, die meist noch etwas Stromata enthielt, in einem Rundkolben mit $\frac{2}{3}$ des Vol. der Mutterlauge an reinem Wasser versetzt. Nach Zugabe einiger Tropfen Octylalkohol wurde der Kolben in einem 30—35° warmen Wasserbade mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Dabei geht bekanntlich das Oxyhämoglobin in das leichter wasserlösliche Hämoglobin über. Nach Füllen des Kolbens mit Stickstoff wurde die rotviolette Hämoglobin-Lösung in Zentrifugengläser gegossen, rasch mit Toluol überschichtet und zentrifugiert, um die letzten Zellreste zu entfernen. Das Toluol haben wir in einem Scheidetrichter abgetrennt und in die Hämoglobinlösung 30 Min. lang Sauerstoff eingeleitet. Die tiefrote Oxyhämoglobinlösung wurde wieder mit 20—25% Alkohol versetzt und zur Krystallisation in den Eisschrank gestellt. Jedes Oxyhämoglobin-Präparat wurde für die Analysen 3-mal in der angegebenen Weise umkrystallisiert.

Die Globine haben wir in Anlehnung an F. N. Schulz¹⁶⁾ und E. Kaiser¹⁷⁾ folgendermaßen dargestellt:

Eine etwa 5-proz. Lösung von frisch hergestelltem, noch feuchtem, 3-mal umkrystallisierten Oxyhämoglobin wurde mehrere Stunden bei 0° stehen gelassen und anschließend bei möglichst niedriger Temperatur zentrifugiert bzw. filtriert. Je 300 ccm der eiskalten Lösung wurden in einen Scheidetrichter, der 160 ccm Alkohol und 300 ccm Äther von 0° enthielt, gegossen. Zu dieser Mischung gaben wir unter Kühlen und Schütteln langsam 10 ccm kalte $n/2$ -HCl und schüttelten weitere 1—2 Min. kräftig. Der Scheidetrichter wurde hierauf in ein Eisbad gestellt, bis sich die Schichten getrennt hatten. Die untere wäßrige Schicht wurde abgelassen und die Extraktion des Hämins mit je 50 ccm Alkohol und 100 ccm Äther 2-mal, immer in der Kälte, wiederholt. Die klare, fast farblose, wäßrige Globin-Lösung wurde im Vak. von Ätherresten befreit und mit $n/1$ -Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Das ausfallende Globin wurde nach Stehenlassen im Eisbad abzentrifugiert, in Wasser suspendiert und erschöpfend gegen dest. Wasser dialysiert. Zur Analyse

¹⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **103**, 16 (1918).

¹⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **24**, 449 (1898).

¹⁷⁾ Biochem. Ztschr. **192**, 58 (1928).

haben wir wie in allen anderen Fällen bei 110° (P₂O₅, 14 mm) getrocknet.

Das untersuchte Insulin verdanken wir dem Werk Höchst der I.-G. Farbenindustrie A.-G. Die Wirksamkeit des Präparates betrug 21 internat. Einh. in 1 mg. Das Vitellin wurde nach H. O. Calvery und A. White¹⁸⁾ aus Eigelb dargestellt.

Für die Überlassung des von F. Lynen und U. Wieland aus Knollenblätterpilzen gewonnenen Phalloidins haben wir Hrn. Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland zu danken.

Der Rockefeller-Foundation sprechen wir für ein, Hrn. F. W. Quackenbush gewährtes Stipendium unseren besten Dank aus.

Tafel 6.

Substanz	Einwaage	Methionin		H ₂ S-Schwefel		Cystin	
		ccm n/250 Na ₂ S ₂ O ₃	%	ccm n/250-J ₂	%	ccm n/250-J ₂	%
Aneurinchloridchlorhydrat	31.0	5 × 0.56	0.90	0.80	0.16	0	0
	34.3	5 × 0.63	0.91	0.75	0.14	0	0
Lactoflavin	12.34	5 × 0.53	2.13	0	0	2.20	8.56
	12.19	5 × 0.49	2.00	0	0	2.17	8.55
Ademinchlorhydrat	2.56	0	0	0	0	0	0
	2.98	0	0	0	0	0	0
Nicotinsäureamid	30.50	5 × 0.21	0.38	0	0	0	0
	29.20	5 × 0.19	0.32	0	0	0	0
Hämin	2.02	—	—	—	—	0.92	21.9
Protoporphyrin	2.02	—	—	—	—	1.15	27.3
Bilirubin	1.95	5 × 0.08	2.04	0	0	0.66	16.3
Astaxanthin	3.14	0	0	0	0	0	0
	2.86	0	0	0	0	0	0
Methyl							
Agar	31.4	5 × 3.62	0.57	1.20	0.25	0.35	0.53
	31.3	5 × 3.65	0.58	1.30	0.27	0.30	0.46
Prontosil	12.4	0	0	35.50	18.35	4.01	15.6
	17.2	0	0	47.60	17.70	4.07	11.4
CH ₃ -SH-Schwefel							
Adenyl-thio-methylpentose	3.624	5 × 2.14	2.95	1.09	3.95	0	0
	2.706	5 × 2.27	3.07	1.20	4.16	0	0
Triacetyl-thio-methylpentose	2.674	5 × 1.58	2.96	0.80	3.84	0	0
	3.000	5 × 1.71	2.85	0.84	3.59	0	0

¹⁸⁾ Journ. biol. Chem. **94**, 635 [1931/32].