

SUMMARY

The unwanted side reactions often encountered in the synthesis of methionine containing peptides can be eliminated by a temporary conversion of the thioether function of methionine into the sulfoxide at any stage of a peptide synthesis. The sulfoxide oxygen is introduced without the formation of a sulfone when a small excess of hydrogen peroxide is used, and its elimination is easily achieved by reduction with thioglycolic acid. In contrast to the carbobenzoxy derivatives of methionine the removal of the carbobenzoxy group from the corresponding sulfoxides proceeds smoothly by mild treatment with concentrated hydrochloric acid. The synthesis of the peptide derivative H-Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met-OH, using this method, is described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

9. Über den Abbau von Glykokoll-[2¹⁴-C] durch Meerschweinchenleberschnitte

von E. Jenny und F. Leuthardt

(15. XI. 60)

Trotzdem Glykokoll zu den am längsten bekannten Aminosäuren gehört, gelang es doch erst in neuerer Zeit, bessere Einsicht in seine Umwandlungen zu gewinnen. Wichtig war dabei die Erkenntnis, dass der Glykokollstoffwechsel mit dem des Serins eng verbunden ist. Der reversible Übergang von Glykokoll in Serin^{1) 2)} hat also eine grosse biochemische Bedeutung. Während der Abbau beider Aminosäuren je nach der Stoffwechsellage verschiedene Wege einschlagen kann³⁾, dürfte die Neusynthese von Glykokoll fast ausschliesslich über Serin erfolgen⁴⁾. Das Kohlenstoffgerüst wird dabei von einer Verbindung geliefert, die leicht aus den Triosen der Glykolyse entstehen kann⁵⁾. Wahrscheinlich ist Hydroxypyruvat oder 3-Phosphohydroxypyruvat direkte Vorstufe^{6) 7)}, während Pyruvat ausgeschlossen werden konnte. Der Abbau von L-Serin scheint hingegen nicht wesentlich über Hydroxypyruvat zu führen. Injiziert man nämlich Ratten L-Serin-[3-¹⁴C] und isoliert darauf die gebildete Leberglucose, so findet man eine starke Randomisierung zwischen C1

1) W. SAKAMI, in A Symposium on Amino Acid Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, Seite 658–683; F. LEUTHARDT & B. GLASSON, *Helv.* 25, 445 (1942).

2) D. SHEMIN, in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XIV, Seite 161–167 (1950).

3) D. ELWYN, J. ASMORE, G. F. CAHILL, JR., S. ZOTTU, W. WELCH & B. HAISTINGS, *J. biol. Chemistry* 226, 735 (1957).

4) H. R. V. ARNSTEIN, in *Advances in Protein Chemistry IX*, Seite 1–91, Academic Press Inc. Publishers, New York (N. Y.) (1954).

5) H. R. V. ARNSTEIN & D. KEGELEVIĆ, *Biochem. J.* 62, 199 (1956).

6) R. E. KOEPPE, M. L. MINTHORN & R. J. HILL, *Federation Proc.* 15, 290 (1956); *Arch. Biochemistry & Biophys.* 68, 355 (1957).

7) A. ICHIHARA & D. M. GREENBERG, *J. biol. Chemistry* 224, 331 (1957).

und C2⁸⁾. Diese tritt aber nach Verabreichung von Hydroxypyruvat-[3-¹⁴C] nicht auf⁹⁾. Pyruvat-[3-¹⁴C] führt jedoch zur gleichen Randomisierung zwischen C1 und C2 der Leberglycose wie L-Serin-[3-¹⁴C]¹⁰⁾, weshalb man annahm, dass aus Serin auf ziemlich direktem Wege Pyruvat entstehen kann.

Das Problem der Serin- und Glykokollsynthese ist eng verknüpft mit dem der Hippursäuresynthese, und frühere Untersuchungen über dieses Thema waren es auch, die Anlass zur vorliegenden Arbeit gaben. Schon lange ist nämlich bekannt, dass verschiedene Aminosäuren *in vitro* die Bildung von Hippursäure durch Ratten- und Meerschweinchenleber verstärken können. Glutamin ist dabei so wirksam, dass man versucht war anzunehmen, es werde die Molekel direkt zwischen Stellung 2 und 3 in Glykokoll und eine C3-Verbindung gespalten¹¹⁾. SHEMAIN wies jedoch nach²⁾, dass der Aminostickstoff des Glutamins in stärkerem Masse zur Glykokollneubildung beiträgt als das C-Atom 2. Glutamin muss also noch auf mindestens einem zusätzlichen Wege die Hippursäurebildung steigern können.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir nachzuweisen, auf welchem Wege beim Meerschweinchen ein Austausch von C-Atomen zwischen Glutamin und Glykokoll stattfinden könnte. Wir untersuchten zuerst den Austausch von Radioaktivität zwischen Glykokoll-[2-¹⁴C] und Glutamin in der Hoffnung, der Reaktionsweg sei reversibel. Diese Versuchsanordnung wurde vor allem in Berücksichtigung der Arbeiten von KOEPE und Mitarbeitern gewählt^{12) 13)}, die zeigten, dass sich anhand der Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen C-Atome isolierter Glutaminsäure sehr gut Rückschlüsse auf den Metabolismus einer radioaktiven Verbindung ziehen lassen. Glykokoll mit nur zwei C-Atomen ist dazu weniger geeignet.

Wir inkubierten Meerschweinchenleberschnitte in KREBS-HENSELEIT-Hydrogencarbonat-Lösung (pH 7,4) mit Glykokoll-[2-¹⁴C] und Glutamin während 2½ Stunden. Darauf wurde das restliche, nicht veratmete Glutamin als kristallisiertes Glutaminsäure-Hydrochlorid isoliert und stufenweise abgebaut. Die relative spezifische Aktivität der einzelnen C-Atome ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen C-Atome der Glutaminsäure nach Inkubation von Meerschweinchenleberschnitten mit Glykokoll-[2-¹⁴C] und Glutamin

Nummern der C-Atome der Glutaminsäure	1	2	3	4	5
Gruppenformel	COOH—CHNH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —COOH				
Spez. Aktivität c/min/mgC	12750	48500	55000	11200	17630
Prozentuale spez. Aktivität	9	33	38	8	12

Die hohe und fast gleiche Aktivität von C2 und C3 sowie die Tatsache, dass C5 stärker markiert ist als C4, machen es wahrscheinlich, dass aus Glykokoll-[2-¹⁴C] Pyruvat-[2,3-¹⁴C] mit stärkerer Aktivität in C2 entstanden ist. Die von KOEPE und

⁸⁾ G. B. NADKARNI, B. FRIEDMANN & S. WEINHOUSE, *J. biol. Chemistry* 235, 420 (1960).

⁹⁾ F. DICKENS & D. H. WILLIAMSON, *Biochem. J.* 72, 496 (1959).

¹⁰⁾ B. R. LANDAU, A. B. HASTINGS & F. B. NESBETT, *J. biol. Chemistry* 214, 525 (1955); B. FRIEDMANN, H. W. LEVIN & S. WEINHOUSE, *ibid.* 221, 665 (1956).

¹¹⁾ F. LEUTHARDT, *Z. physiol. Chem.* 270, 113 (1941).

¹²⁾ R. E. KOEPE & R. J. HILL, *J. biol. Chemistry* 216, 813 (1955).

¹³⁾ R. J. HILL, D. C. HOBBS & R. E. KOEPE, *J. biol. Chemistry* 230, 169 (1958).

sich die Bildung von Pyruvat-(2,3-¹⁴C] aus Glykokoll-[2-¹⁴C] und die Bildung von α -Ketoglutar säure und Glutaminsäure mit der von uns gefundenen Markierungsverteilung nach Eintritt von Pyruvat-[2,3-¹⁴C] in den Zitronensäurecyclus erklären kann, ist in einem Schema dargestellt.

a) Glykokoll kann unter intermediärer Bildung von Glyoxylsäure in CO₂ und Formiat gespalten werden. Dies führt bei einer C2-Markierung des Glykokolls zu radioaktivem Formiat¹⁵⁾.

b) Glykokoll geht ausserdem leicht in Serin über^{1) 2)}. Bei einer C2-Markierung des Glykokolls entsteht dabei Serin-[2,3-¹⁴C]¹⁶⁾. Die Hydroxymethylgruppe weist dabei eine schwächere Markierung auf als C2, da das durch Reaktion a) gebildete aktive Formiat im endogenen Formiatpool verdünnt wird.

c) Serin kann durch eine Serindehydratase direkt in Pyruvat und Ammoniak gespalten werden. Das Ferment wurde schon 1943 durch CHARGAFF & SPRINSON bei Säugetieren vermutet¹⁷⁾ und konnte später durch SAYRE & GREENBERG beim Schaf nachgewiesen werden¹⁸⁾. Wie wir später zeigen werden, kann auch Meerschweinchenleber Serin direkt in Pyruvat überführen.

d + e) Das durch Reaktion c) gebildete Pyruvat-[2,3-¹⁴C] tritt nun über bekannte Zwischenstufen in den Zitronensäurecyclus ein und führt dabei zur Bildung von α -Ketoglutar säure und durch Transaminierung auch zu Glutaminsäure mit dem von uns gefundenen Aktivitätsmuster.

Der Markierungsausgleich zwischen C2 und C3 ist durch das Gleichgewicht der aus Pyruvat durch Carboxylierung gebildeten Oxalessigsäure mit symmetrischen C4-Säuren bedingt¹⁹⁾. C2 + C3 sind stärker markiert als C4 + C5. Da wir Hungertiere verwendeten, wurde das radioaktive aus Pyruvat-[2,3-¹⁴C] entstehende Acetat-[1,2-¹⁴C] durch endogenes Acetat aus dem Fettstoffwechsel verdünnt²⁰⁾. Das Verhältnis der Radioaktivität zwischen C4 und C5 ist natürlich kein Mass für die endogene Verdünnung des aktiven Formiates. Ein Teil der Aktivität von C4 stammt sicher aus dem ursprünglichen C2-Atom des Pyruvats, da sicher auch eine gewisse Menge des in Acetat übergehenden Pyruvats vorher über symmetrische C4-Säuren randomisiert wurde¹⁹⁾.

Die Frage, ob nicht doch ein Teil des Serins über Hydroxypyruvat abgebaut werden kann, ist mit unserer Veruchsanordnung nicht zu entscheiden, da sowohl beim Weg über Pyruvat wie über Hydroxypyruvat die gleiche Markierungsverteilung auftreten müsste. Nach Ansicht mehrerer Autoren ist jedoch der indirekte Weg wenig wahrscheinlich^{8) 10)}. Zum Beweis des direkten Überganges von Serin in Pyruvat versuchten wir, Serindehydratase-Aktivität in der Meerschweinchenleber nachzuweisen. Überstehendes von Meerschweinchenleber-Homogenat wurde mit Serin und Pyridoxalphosphat inkubiert. Ein Parallelversuch mit vorher auf 100° erhitztem Überstehendem sollte ferner zeigen, ob Serin eventuell durch Pyridoxalphosphat allein gespalten werden kann. Die Resultate sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

¹⁵⁾ S. WEINHOUSE, in A Symposium on Amino Acid Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, Seite 638–657.

¹⁶⁾ P. SIEKEVITZ & D. M. GREENBERG, J. biol. Chemistry 180, 845 (1949); 186, 275 (1950); W. SAKAMI, *ibid.* 176, 995 (1948); 178, 519 (1949).

¹⁷⁾ E. CHARGAFF & D. B. SPRINSON, J. biol. Chemistry 151, 273 (1943).

¹⁸⁾ F. W. SAYRE & D. M. GREENBERG, J. biol. Chemistry 220, 787 (1956).

¹⁹⁾ R. E. KOEPE, G. A. MOURKIDES & R. J. HILL, J. biol. Chemistry 234, 2219 (1959).

Da ein Ansatz ungefähr 15 mg Eiweiss enthielt, beträgt die enzymatisch gebildete Pyruvatmenge nach Abzug des Blindwertes etwa $4 \mu\text{g}/\text{mg Eiweiss}/\text{Stunde} = 0,045$ Mikromol/mg Eiweiss/Std. Die von SAYRE & GREENBERG gefundene Aktivität eines Rohhomogenates aus Schafsleber betrug $0,048$ Mikromol/mg Eiweiss/Std.

Tabelle 3. *Bildung von Pyruvat aus L-Serin durch Überstehendes von Meerschweinchenleber-Homogenat.*
Genauere Versuchsbedingungen im experimentellen Teil.

Nummer des Ansatzes	1	2	3	4	5	6	7	8
Nicht erhitztes Überstehendes	+	+	+	+	-	-	-	-
Erhitztes Überstehendes	-	-	-	-	+	+	+	+
L-Serin $1,6 \times 10^{-2} \text{M}$	-	-	+	+	-	-	+	+
Gebildete Pyruvatmenge in $\mu\text{g}/\text{Stunde}/\text{Ansatz}$	16	15	77	73	12	11	18	11

Während der Abfassung dieser Arbeit wurden wir auf eine neue Arbeit von SELIM & GREENBERG aufmerksam²¹). Darnach beträgt K_m für gereinigte Serindehydratase aus Rattenleber $8,1 \cdot 10^{-2} \text{M}$, so dass die von uns bestimmte Aktivität wahrscheinlich zu niedrig ist. Trotzdem zeigt der Versuch, dass auch beim Meerschweinchen der Abbau von Serin direkt zu Pyruvat führen kann.

Der hier dargestellte, von Glykokoll zu Glutaminsäure führende Reaktionsweg ist jedoch nicht reversibel, da die Wasserabspaltung durch die Serindehydratase praktisch irreversibel ist. Die Resultate mit der von uns gewählten Versuchsanordnung weisen nicht darauf hin, dass C-Atome zwischen Glutamin und Glykokoll auf einem direkten Wege, z. B. durch Kondensation von Glykokoll mit einem C3-Stück oder direkte Spaltung von Glutamin zwischen den C-Atomen 2 und 3 ausgetauscht werden können.

Da nach neueren Untersuchungen glykolytische Triosen Vorstufen der Serinbildung sind, können C-Atome von Glutamin und Glutaminsäure auf bekanntem Wege über Oxalacetat, Phosphoenolpyruvat und 3-Phosphoglycerinsäure zur Bildung von Serin und damit auch von Glykokoll beitragen. Für die Transaminierung von Hydroxypyruvat²²) und Phosphohydroxypyruvat zu Serin und Phosphoserin bzw. ist Glutaminsäure ein wirksamer Aminogruppendonor⁷). Dies wäre eine Erklärung für die Beobachtung von SHEMIN, dass der Aminostickstoff der Glutaminsäure in stärkerem Masse zur Glykokollneubildung beiträgt als das C-Atom 2.

Experimenteller Teil

A. *Inkubation von Meerschweinchenleberschnitten mit Glykokoll-[2-¹⁴C] und Glutamin.* Zu allen Versuchen verwendeten wir Meerschweinchen eigener Zucht von 200–300 g Gewicht. Die Tiere konnten während 15 Std. vor dem Versuch keine Nahrung zu sich nehmen, hatten jedoch freien Zugang zu Wasser. Leberschnitte wurden nach früher angegebener Vorschrift präpariert¹¹).

²⁰) A. D. FREEDMANN & S. GRAFF, J. biol. Chemistry 233, 292 (1958).

²¹) A. S. M. SELIM & D. M. GREENBERG, J. biol. Chemistry 234, 1474 (1959).

²²) H. J. SALLACH, in A Symposium on Amino Acid Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, Seite 782–787.

Pro Versuch verwendeten wir Schnitte von ungefähr 500 mg Trockengewicht. Das Inkubationsmilieu enthielt 15 ml KREBS-HENSELEIT-Lösung mit Hydrogencarbonatpuffer pH 7,4²³), 10 mg Glykokoll-[2-¹⁴C] mit einer Totalaktivität von 200 Mikrocurie (durch entsprechende Verdünnung von Glykokoll-[2-¹⁴C], hergestellt durch The Radiochemical Center, Amersham, England), 22 mg Glutamin «ROCHE» und 0,5 ml 1-proz. (w/v) NH₄Cl.

Es erwies sich als notwendig, Glykokoll-[2-¹⁴C] von beigemengter Bromessigsäure-[2-¹⁴C] zu reinigen. Nach zwei Passagen über den Anionenaustauscher Amberlite JR 4B in der OH⁻-Form war das Produkt genügend rein. Bromessigsäure musste entfernt werden, da sie papierchromatographisch fast den gleichen Rf-Wert aufweist wie Glutaminsäure.

Vor der Inkubation wurde der Ansatz mit «Oxycarbon» (95% O₂, 5% CO₂) äquilibriert. Die Inkubation erfolgte in geschlossenen Gefässen mit flachem Boden während 2 1/2 Std. im WARBURG-Apparat. Temperatur 38°, Schüttelfrequenz 70/min. Die Versuche wurden durch Zugabe von 5 ml 20-proz. Trichloressigsäure unterbrochen. Darauf wurden die Schnitte entfernt. Die Lösung, sowie die in einem Glashomogenisator in 10-proz. Trichloressigsäure zerkleinerten Schnitte wurden bei 1500 g 30 Min. zentrifugiert.

B. *Isolierung und Abbau von Glutamin*-[¹⁴C]. Das klare Überstehende wurde auf eine Säule von Dowex 50, 100–200 mesh, H⁺-Form, gegeben und bis zur Neutralität des Effluens mit H₂O gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 ml 1N Ammoniak. Das Eluat wurde bei 70° auf dem Wasserbad zur Trockene gedampft und der Rückstand in 10 ml 6N HCl 2 Std. unter Rückfluss hydrolysiert. Die HCl wurde *in vacuo* abgedampft, der Rückstand in 5 ml H₂O aufgenommen und auf eine Säule von Amberlite JR 4B, pH 3, gegeben²⁴). Darauf wurde mit 100 ml H₂O nachgewaschen und mit 1N HCl eluiert. Die Fraktion 10–20 ml enthielt die aktive Glutaminsäure, die beim Eindampfen meist spontan als Hydrochlorid kristallisierte. Das Produkt ergab bei der Papierchromatographie (Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 bm, Lösungsmittel: Phenol/Ammoniak) einen einzigen ninhydrinpositiven Fleck auf der Höhe authentischer Glutaminsäure. Im Radioautogramm erwies sich die Glutaminsäure als aktiv. Ausserdem trat eine zusätzliche Schwärzung auf, deren Rf mit dem von Pyrrolidincarbonsäure identisch war.

Aus sechs Versuchen isolierte aktive Glutaminsäure, zusammen ungefähr 50 mg, wurden mit 12 mMol (1764 mg) DL-Glutaminsäure (ROCHE) als Träger in 3N HCl 2 Std. unter Rückfluss gekocht, um alle Pyrrolidincarbonsäure in Glutaminsäure überzuführen. Darauf wurde am Vakuum auf ungefähr 8 ml eingedampft, die Lösung gekühlt (Eisbad) und mit HCl-Gas gesättigt. Nachdem der Ansatz 3 Tage bei –7° gehalten worden war, wurde von den ausgefallenen Kristallen abgenutscht, die Mutterlauge auf 4 ml eingengt und erneut mit HCl-Gas gesättigt. Die Gesamtausbeute betrug 1985 mg Glutaminsäurehydrochlorid. Da Asparaginsäure in konzentrierter Salzsäure löslich ist, wären auf diese Weise eventuell beigemengte Spuren abgetrennt worden. Die Glutaminsäure wurde nach der Methode von MOSBACH, PHARES & CARSON²⁵) stufenweise unter Berücksichtigung der Modifikationen von KOEPPE & HILL¹²) abgebaut. Das C-Atom 1 bestimmten wir mit der Ninhydrinmethode²⁶). Freie Glutaminsäure erhielten wir nach Neutralisation des Hydrochlorides mit Anilin durch Ausfällen mit Äthanol. Die spezifische Aktivität der einzelnen C-Atome differierte in 2 Abbauversuchen um nie mehr als 5%.

Bei Verwendung der oben erwähnten Abbaumethode wird der Kohlenstoff der einzelnen Positionen als BaCO₃ isoliert. Ausserdem behielten wir jeweils kleine Mengen der Zwischenstufen zurück (Na-Butyrat, Na-Propionat, Na-Acetat). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach zwei Methoden. Die Substanzen wurden in kleine Plastikschaalen von 4 cm² Bodenfläche gegeben, mit einem GEIGER-MÜLLER-Endfenster-Zähler während 3 × 10 Min. ausgezählt und das Resultat auf unendliche Schichtdicke extrapoliert. Ausserdem wurden die organischen Verbindungen in einer von RUTSCHMANN²⁷) beschriebenen Apparatur feucht verascht und die Aktivität des gebildeten CO₂ in einem BERNSTEIN-BALLENTINE-Zählrohr bestimmt. CO₂ wurde aus BaCO₃ durch 10-proz. Phosphorsäure freigesetzt. Die Apparatur gestattet zusätzlich die Bestimmung der Kohlenstoffmenge, so dass wir in einem Arbeitsgang die spez. Aktivität berechnen konnten.

²³) H. A. KREBS & K. HENSELEIT, Z. physiol. Chemie 270, 33 (1932).

²⁴) R. CONSDEN, A. H. GORDON & A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 42, 443 (1948).

²⁵) E. H. MOSBACH, E. F. PHARES & S. F. CARSON, Arch. Biochem. Biophysics 33, 179 (1951).

²⁶) L. P. VERNON & S. ARONOFF, Arch. Biochem. Biophysics 29, 179 (1950).

²⁷) J. RUTSCHMANN, Helv. 40, 428 (1957).

Die in Tabelle 1 angegebenen Werte sind Mittel aus 2 Abbauversuchen. Die spez. Aktivität der Glutaminsäure betrug 31400 Impulse/min/mg C und unter Berücksichtigung der etwa 35fachen Verdünnung durch Träger $1,09 \times 10^6$ Impulse/min/mg C.

C. *Bestimmung von Serindehydrataseaktivität in Meerschweinchenleber.* Meerschweinchenleber wurde in 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 mit einem Glashomogenisator zerkleinert und 30 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Die Hälfte des Überstehenden wurde 5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt und nachher von den ausgefallenen Proteinen abzentrifugiert. Sämtliche Ansätze enthielten 1 ml erhitztes oder nicht erhitztes Überstehendes, 1 ml 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 7,4, Pyridoxalphosphat 10^{-4} M und Adenosintriphosphat 10^{-3} M. Die Ansätze mit Serin wiesen eine Aminosäurekonzentration von $1,6 \times 10^{-2}$ M auf. Das Volumen pro Ansatz betrug 4 ml. Die Inkubation erfolgte unter Vakuum in THUNBERG-Röhrchen bei 38° während 30 min. Pyruvat wurde nach FRIEDEMANN & HAUGEN bestimmt²⁸⁾.

Diese Arbeit wurde durch einen Fonds der ELI LILLY AND COMPANY ermöglicht, der wir für ihre Unterstützung bestens danken möchten.

SUMMARY

Slices of guinea-pig liver were incubated in the presence of glycine-[2-¹⁴C] and glutamine. The distribution of radioactivity among the different carbon atoms of the isolated glutamine is consistent with the view that glycine is metabolized *via* serine and pyruvic acid. Direct conversion of serine to pyruvic acid in guinea-pig liver is also shown to take place.

Biochemisches Institut der Universität, Zürich

²⁸⁾ TH. E. FRIEDMANN & G. E. HAUGEN, J. biol. Chemistry 147, 415 (1943).

10. Eine einfache Methode zur Bestimmung von ³⁵S in biologischem Material

von K. Schmid

(15. XI. 60)

1. Einleitung. – Bei weichen β -Strahlern, wie dem Radioschwefel (³⁵S), muss bei Radioaktivitätsmessungen der Selbstabsorption Rechnung getragen werden. Die Messproben müssen daher in gleichwertiger, wohldefinierter Form vorliegen. Für exakte Bestimmungen wird mit Vorteil Barium- oder Benzidinsulfat verwendet. Zur Oxydation des Schwefels stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Oxydation nach CARIUS¹⁾, wobei die Probe mit Salpetersäure-Perchlorsäure nass verascht wird, liefert zuverlässige Werte, ist aber speziell bei fettreichem biologischem Material sehr zeitraubend²⁾ und erfordert häufige Überwachung. Die elegante Kolbenverbrennung nach SCHÖNIGER³⁾ ist vorwiegend für kleine Substanzmengen geeignet und daher bei biologischen Proben nicht immer befriedigend.

1) S. S. WALKENSTEIN & C. M. KNEBEL, Analyt. Chemistry 29, 1516 (1957); G. A. NEČJEVA, Biochimija 21, 723 (1956); J. KATZ & S. B. GOLDEN, J. Lab. clin. Med. 53, 658 (1959).

2) K. H. MENKE, Z. Tierernährung Futtermittelkunde 12, 135 (1957).

3) W. SCHÖNIGER, Microchim. Acta 1956, 869; A. HABERSBERGEROVÁ-JENÍČKOVÁ & J. ČÍFKA, Coll. czechoslov. chem. Comm. 24, 3777 (1959).