

## Új módszer lisztkivonatok szulfhidril-tartalmának meghatározására I.

NOSTICZIUS ÁRPÁD

*Agrártudományi Főiskola, Kémia-Talajtani Tanszék,  
Mosonmagyaróvár*

Agrokémiai szempontból a következők indokolják a szulfhidril gyök (továbbiakban —SH) kérdésével való foglalkozást:

1. Sok enzimre aktiválólólag hat, mennyisége tehát befolyásolja a jelenlevő enzimek működését.

2. Számos enzimnek alkotórésze, illetve az enzim fehérjéjének aktív gyöke. Megszüntetve ezen aktív csoportot, csökken vagy megszűnik az enzim hatásossága.

3. A fehérjék denaturálódási folyamatai is követhetők a szulfhidril-gyök mennyiségi változásával. Denaturálódás hatására általában nő az —SH mennyisége.

4. Tümpontot adhat a — még kevésbé ismert — fehérjék közötti kapcsolat felderítésében.

5. Végérvényesen eldöntheti a liszt-javítószer hatását alkotott elképzelés érvényességét. JÖRGENSEN [16, 17] feltételezése szerint a lisztjavító anyagok — melyek oxidálószer — azáltal hatnak, hogy az enzimek aktiválásához szükséges —SH gyököt oxidálják, így a liszt proteázai a papainhoz hasonlóan veszítenek aktivitásukból. Ezen elmélet még ma sincs bizonyítva, sem kellően cáfolva, éppen a szulfhidril meghatározási módszerek nehézkessége miatt.

6. Az előbb említettek miatt a szulfhidril meghatározás esetleg egy új lisztminősítési módszer alapjává válhat.

### A szulfhidrilcsoport mennyiségi meghatározásának módszerei

Az —SH-csoport mennyiségi meghatározására igen sokféle módszert dolgoztak ki. Leggyakrabban a nitroprusszid-Na-os mérést használják, mert ez közel specifikus reagens a kérdéses gyöknek. Mivel elég sok hátrányos tulajdonsága van, azért a nitroprusszid-Na mellett egyéb vegyszert is alkalmaznak, hogy ezzel némileg csökkentsek rossz tulajdonságait. Így pl. EDSALL, GREENSTEIN és MEHL [10], illetve ennek folytatásaként GREENSTEIN és EDSALL [11] a nitroprusszid-Na mellett porfirindint használnak. Ők utalnak arra, hogy a nitroprusszid-Na sem egészen specifikus reagens, mert a karbonilcsoportok is hasonló, de más árnyalatú és állandóságú színt adnak, míg az általuk használt másik reagens a porfirindin a tirozinnal és fenollokkal is reagál, bár ennek a reakciónak sebessége jóval kisebb.

EDELHOCH és társai [9] a nitroprusszid-Na mellett szerves higany sókat próbáltak ki. Eljárásuk menete: a vizsgálandó anyagot guanidinbromidban oldják, majd a nitroprusszid-Na hozzáadása után fellépő hiborszín eltűné-

séig  $\text{CH}_3\text{HgNO}_3$ -mal titrálják. Látszatra könnyűnek látszik a mérés, azonban a guanidinbromid előállítás — melyet a közlemény tartalmaz — és a titrálásnak  $0^\circ\text{C}$ -on való végrehajtása máris nehézkessé teszi a meghatározást.

Kolorimetriás módszer formájában ferricianid jelenlétében használja fel a nitroprusszid-Na-t BAKER, PARKER és MIZE [2].

Szívesen használnak elektrokémiai módszereket is, bár ezek már korántsem specifikusak. KOLTHOFF, STRICKS és MORREN [19] amperometrikus titrálást hajtanak végre. Mérőoldatként  $\text{HgCl}_2$ -ot használnak, forgó platinaelektrod mellett. A vizsgálandó anyag egyrészét először ismert mennyiségű N-ethylmaleimiddel kezelik, mely —SH reagens lévén, megköti a vizsgálandó anyag —SH-tartalmát. Majd ehhez az oldathoz ismert mennyiségű kristályos marh plazma-albumint adnak, (mely szabad —SH-csoportot tartalmaz) és a feleslegben maradt plazmaalbumin —SH-tartalmát határozzák meg  $\text{HgCl}_2$ -os amperometrikus titrálással. Magát a titrálást sem lehet közvetlenül véghezvinni, először el kell távolítani a proteineket, és az amperometrikus titrálást nitrogén atmoszféra alatt elvégezni. Körülményes a meghatározás már csak a nitrogén atmoszféra miatt is, de nem adhat pontos eredményt sem, hiszen többszörös visszattitrálást alkalmaznak.

Az amperometrikus titrálás egy másik módszerét BENESH, LARDY és BENESH [3] dolgozta ki. Az amperometrikus titrálást ők  $\text{AgNO}_3$  jelenlétében végezték el. Mivel az ezüstion hajlamos csapadékképzésre, ezért kénytelenek komplexbe vivő anyagot alkalmazni. E célból trisz (hidroximetil)-amminometánt adagolnak a vizsgálandó anyaghoz. Ennek a használatá azért is előnyös, mert egyidejűleg pufferhatást is fejt ki. MATSUMOTO és társai [27], valamint KOLTHOFF és társai [18] számolnak be az ún. higanytócsa titrálásról, amelynél fémhiganyt használnak elektródként.

A másik gyakran használt elektrokémiai módszer a polarográfus meghatározás. BRDICKA [4, 5, 6] észlelte először, hogy az ammóniás kobaltiont tartalmazó közegben végzett polarográfiai analízis a fehérjék mennyiségére jellemző áramerősség-feszültség-görbét ad. Hasonló görbét észleltek cisztein-nél is. Ezért a kezdetben protein mérésére használt meghatározást az —SH mennyiségének mérésére alkalmazták. LAITINEN és SULLIVAN [21] már különböző lisztkivonatok —SH tartalmát határozták meg polarográfiaisan. Tizenhárom különböző búzaliszt —SH-tartalmát határozta meg DE LANGE és HINTZER [8]. A meghatározáshoz a proteinoldaton kívül  $\text{NH}_4\text{OH}$ -ot,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -t és  $\text{CoCl}_2$ -t tartalmazott az oldat. Anódként normál kalomel elektródot, katódként pedig csepegő higany elektródot használtak. Maguk a szerzők is megjegyzik, hogy polarográfiai eljárástól nem is követelhető precíz kvantitatív —SH-tartalom meghatározás. A szerzők elismerik, hogy a diszulfidcsoportok egy része felhasad —SH-ra, ahogy ez a cisztin esetében is történik. Ezért csak látványosan —SH-tartalomról beszélnek.

Gyakran használt —SH-meghatározási módszer az *o*-jodozobenzoesavval való mérés. Maga az ötlet HELLERMANN, CHINARD és RAMSDALL [13] cikkében található meg, majd NORDIN és SPENCER [28] használhatóbbá alakították, míg HOLME és SPENCER [15] végül egy titrimetriás módszert fejlesztettek ki belőle. Tovább módosította a vizsgálatot KONG, MECHAM és PENCE [20]. A módszer lényege, hogy az *o*-jodozobenzoesav oxidálja a liszt —SH-csoportját. A meghatározás úgy történik, hogy standard Na-*o*-jodozobenzoesavat adnak a liszt-víz 1 : 4 keverékéhez, extrahálják vagy digerálják (az a kérdés, hogy mi a cél), vagy csak 3—5 percig állni hagyják az elegyet. Ha lisztszuszpenzióról

volt szó, akkor centrifugálják is. Az így kapott oldathoz ismert mennyiségű és titerű, de főlős  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ot adva ecetsavval gyengén megsavanyítva KJ-ot adnak hozzá. A feleslegben maradt Na-*o*-jodozobenzóáttól és a KJ-ból elemi jód válik szabaddá, ez a tioszulfát bizonyos mennyiségét elhasználja, és végül a feleslegben maradt tioszulfátot valamilyen jodometriás módszerrel meghatározzák. Elegánsnak tűnő módszer, azonban a többszörös visszatitrlás már maga nagy hibalehetőséget jelent. Ezzel a módszerrel kapott —SH-mennyiségek jóval nagyobbak, mint a szokásos —SH-tartalmak.

ANSON [1] *p*-kloromerkuribenzoátot használ. Ez a módszer számos előnnyel rendelkezik, de ultraibolya tartományban kell a kapott szint értékelni, és ez spektrofotométer hiányában lehetetlenné teszi az eljárás használatát.

Ezeket kívül meglehetősen sok —SH-meghatározási módszer ismeretes még, így pl. TURNER és HAPPOLD [32] klóracetofenont, ROSNER [30] mono-jódecetsavat, HELLERMANN [14] porfirindines meghatározást, MACDONELL [24] káliumferricianidot, MATSUMOTO és HLYUKA [26] N-etil maleimidet, HARLAND, COULTER és JENNES [12] tiamindiszulfidot használ.

Különböző —SH-meghatározási módszereket hasonlít össze SOKOL, MECHAM és PENCE [31]: *p*-kloromerkuribenzoátos, N-etil-maleimides, jódecetamidós módszereket és az ezüst-nitrátos amperometrikus titrlást. A különböző módszereket összehasonlítva a szerzők megállapították, hogy a jódecetamid lomha reagens. Ahhoz, hogy a reakció teljesen végbemenjen, 24 óra szükséges, de még így sem mérjük a teljes —SH-mennyiséget, tehát voltaképpen nem használható. A másik reagens, a *p*-kloromerkuribenzoát szintén nem adott kielégítő eredményt, mert a reagens és az —SH-csoport közötti reakció megfordítható lévén, csak egészen nagy reagensfelesleg jelenlétében használható. Az N-etilmaleimid nem fér hozzá minden —SH-gyökhöz a szerzők véleménye szerint.

### Az —SH-csoport meghatározásának új módszere

Bár nagyon sok meghatározási mód ismeretes, mégis új eljárás kidolgozására volt szükség, mivel az eddigiek általában nagyon munkaigényesek — azaz sorozatvizsgálatra alkalmatlanok — vagy olyan felszerelést igényelnek, melynek beszerzésére nehezen nyílik lehetőség, vagy a kapott eredmények reprodukálhatósága nem megfelelő.

Az új módszer kiindulási alapja az az észlelet, hogy a  $\text{J}^-$  elemi jód feleslegében éles fényabszorpció-maximumot ad 300—400 nanométer (millimikron) között és az abszorpció nagysága a  $\text{J}^-$  mennyiségétől függ. Bár spektrofotométerrel nem volt módomban megmérni az abszorpció-maximum pontos értékét, közelítő pontossággal meghatározható „uvifot”-tal. Az 1. táblázat az uvifottal kapott értékeket tünteti fel különböző hullámhosszakon ugyanazon három jodidiont tartalmazó jódoldat esetében. A vizsgálat folyamán a jodidion mennyiséget 4 ml oldat tartalmazta és ehhez adtam 4 ml 0,06%-os jég-ecetes jódoldatot. 4 ml desztillált vizet és 4 ml 0,06%-os jódoldatot tartalmazó „vak”-kal szemben mértem az oldatokat.

A jodid-jód-rendszer esetén fellépő ezen fényabszorpció jól felhasználható —SH-meghatározásra, mivel a jód oxidálószer lévén, oxidálja a jelenlévő —SH-t, miközben jodidionná alakul, ennek mennyisége viszont mérhető fotometriásan. Igazán pontos értékeket az 1. táblázat alapján 366 nm-nél kapnánk, mivel azonban csak Pulfrich-fotométer állt rendelkezésemre, kénytelen voltam

## 1. táblázat

A jodid—jód rendszer abszorpcióértékének változása a fény hullámhossza függvényében.  
(A táblázat extinkcióértékeket tartalmaz.)

(1) R fény hullámhossza nm-ben	(2) Extinkció		
	10. 10 <sup>-6</sup> g J <sup>-</sup>	20. 10 <sup>-6</sup> g J <sup>-</sup>	30. 10 <sup>-6</sup> g J <sup>-</sup>
254 .....	0,105	0,215	0,295
313 .....	0,560	0,850	0,950
366 .....	0,800	1,280	∞
375 .....	0,760	1,200	1,660
405 .....	0,255	0,420	0,595
436 .....	0,130	0,202	0,272
480 .....	0,045	0,055	0,065
Pulfrich 1-es szűrő 420 nm .....	0,150	0,290	0,450

megelégedni az itt elérhető legrövidebb hullámhosszal, 420 nm-el. Az 1. táblázat alapján látható, hogy bár alacsonyabb, de arányosan változó értékek érhetőek el a Pulfrich-fotométer 1-es színszűrőjével is.

A lisztkivonatok optikai vizsgálatánál jelentős nehézséget jelent az a tény, hogy vegyszerek hozzáadása hatására könnyen megindulhat a fehérjék koagulálása, az oldat opalizál, ami nagy hibalehetőséget rejt magában, mert meghamisítja a fényabszorpció értékét. E zavaró lehetőség elkerülése végett olyan vegyszerben kell magát a reagensjódot oldanom, mely a fehérjéknek jó oldószere, de ezzel egyidejűleg a vízzel is jól elegyedik. A desztillált vizes, acetonos, metil és etilalkoholos jódoldat azonnal opalizálást von maga után. Az acetonnak megvan még az a kellemetlen tulajdonsága is, hogy jód-aceton keletkezése közben fogyasztja a reagenst. MANGELS [25] és LUSENA [23] számoltak be arról, hogy a kis szénatomszámú szerves savak jól oldják a fehérjéket. A hangyasavtól el kellett tekintenem, mert önmaga is redukáló tulajdonságú, az ecetsav viszont teljes mértékben kielégítette a részére támasztott követelményeket. Így a reagensként használt jódot tömény ecetsavas közegben alkalmaztam.

*Zavaró anyagok vizsgálata:*

Mivel lisztek —SH-tartalmának meghatározásáról van szó, a redukáló szervesanyagok vagy jelentős mennyiségű J<sup>-</sup> okozta hibától nem kell tartanunk. A redukáló szervesanyagok közül a cukrok zavarhatnak. Mivel azonban savanyú közegben játszódik le a reakció, ezek redukáló tulajdonsága itt nem érvényesül. Ezt szemlélteti a 2. táblázat. A mérés folyamán a vizsgálandó anyagmennyiség 4 ml oldatban foglalt helyet, ehhez adtam 4 ml 0,02%-os jégecetes jódoldatot. A reagensek összeöntése után 1,5 órával olvastam le az értékeket, 420 nm-en. A táblázat adatai két mérés átlagértékét tartalmazzák.

PECZNIK [29] szerint a búza teljes cukortartalma 2—5%, a rozsa 1,87—3,00% és ez szinte teljes egészében nem redukáló szacharózból áll. A keményítő búza esetében 58—76%-ot, rozsnál 57,7—62,7%-ot tesz ki. A vizsgálatához

általában 1 ml 5%-os lisztkivonatot használok, ebben az összes cukor maximális mennyisége 0,0025 g lehet. Amint a táblázatból látható, ha az összes cukor egész mennyiségének tízszeresét redukáló cukorban (glükózban) mérem be, még ez sem jelent hibaforrást.

Gondoltam arra, hogy a nagy mennyiségű  $\text{NH}_2$ -gyök is redukálhat némi-  
leg, ezért aszparaginból és leucinből mértem be 0,2 g fehérje/100 ml-nek megfelelő mennyiséget, majd másik mintában ezek tízszeresét alkalmaztam. 0,02%-os jégecetes jóddoldattal mint reagenssel még egy napig állva is a „vak”-kal azonos értéket mutattak. (5%-os desztillált vizes lisztkivonat esetén kb. 0,1 g fehérje/100 ml a fehérje koncentrációja.)

2. táblázat

A keményítő, illetve cukrok zavaró hatásának vizsgálata

(1) Vizsgált anyag	(2) Extinkció. 100
1 gamma —SH .....	12,3
2 gamma —SH .....	20,5
3 gamma —SH .....	27,5
4 gamma —SH .....	35,3
5 gamma —SH .....	41,3
0,0025 g szacharóz .....	0,0
0,0025 g fruktóz .....	1,0
0,0025 g glükóz .....	0,5
1 ml oldható keményítő-oldat* .....	2,0
0,025 g szacharóz .....	0,3
0,025 g glükóz .....	3,5

\* 5 g p. a. amyllum solubile 100 ml deszt. vízzel 1 órán rázatva, majd centrifugálva.

A reagens töménységének befolyása :

A reagensként alkalmazott jódtöménysége nagymértékben befolyásolja a mérési eredményeket. Maga a jódt elég erős oxidálószer. Töményebb mennyiségben még a viszonylag stabil diszulfid-kötéseket is megtámadja. Különösen feltűnő a változás a reakcióidő előrehaladtával.

Az ilyen viszonylag nagy (0,1%-os) jódtöménység olyan erős oxidáló hatást fejt ki, hogy — amint ez a 3. táblázatból látható — a metionin szinte azonnal szabad —SH-ként viselkedik, bár jóval kisebb mértékben, mint a cisztein. A meghatározásnál úgy jártam el, hogy 2,5 ml vizsgálandó oldathoz hozzáadtam 2,5 ml 0,1%-os jégecetes jóddoldatot. Az értékeket Pulfrich-fotométer 1-es színszűrőjével 0,5 cm hosszúságú kivetta használata mellett kaptam. A fotométerhez Elpho II. toldalék csatlakozott.

Csökkenve a jódt koncentrációját, a diszulfid-csoportok felbomlása is jelentősen csökken. 0,02%-os jódreagenst alkalmazva a reakció kezdetétől számított három óra múlva 1 gamma —SH-nak megfelelő mennyiséget mutat a bemért 100 gamma —SH-val egyenértékű cisztin. De a tioéter csoport jelenléte még ilyen körülmények között is lényegesen zavar. Ezt szemlélteti a

## 3. táblázat

A cisztein- és metionin-értékek változása a (reagensek összeöntésétől számított) reakcióidő függvényében. Az adatok százszoros extinkcióértékben vannak feltüntetve

(1) Vizsgált anyag	(2) Reakcióidő									
	15'	30'	45'	60'	75'	90'	120'	150'	180'	30 óra
2 gamma —SH .....	17,5	18,5	19,0	20,0	21,0	20,5	18,0	18,5	19,0	18,2
4 gamma —SH .....	34,0	36,0	37,0	37,5	38,0	37,0	35,0	35,0	35,0	32,0
6 gamma —SH .....	46,5	48,0	49,0	49,5	50,0	49,0	47,0	47,0	47,0	43,0
8 gamma —SH .....	59,5	61,0	61,0	61,5	62,0	61,5	59,0	59,0	59,2	55,0
10 gamma —SH .....	70,0	71,5	71,5	72,0	72,5	71,5	69,5	69,5	69,5	63,5
5 gamma —SH-nak megfelelő metionin .....	15,5	17,5	18,5	19,5	20,5	19,5	17,5	17,5	18,0	16,0
10 gamma —SH-nak megfelelő metionin .....	30,0	32,0	32,5	33,5	34,3	33,5	31,0	31,0	31,0	30,0
5 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	0,0	4,0	5,5	7,5	8,7	10,0	8,5	9,5	11,0	19,5
20 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	4,0	8,7	11,3	14,0	16,0	17,2	16,5	18,2	20,0	40,0
100 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	15,0	22,0	26,0	30,5	34,0	36,0	37,5	40,5	44,2	100,0

4. táblázat. A meghatározás folyamán úgy jártam el, hogy a 4 ml vizsgálandó oldathoz hozzáadtam 4 ml 0,02%-os jóddoldatot. A leolvasás 2 cm élhosszúságú küvetében, 4 ml desztillált vizet és 4 ml 0,02%-os jégecetes jóddoldatot tartalmazó „vak”-kal szemben 420 nm-en történt.

## 4. táblázat

Viszonylag híg — 0,02%-os — jóddoldat hatása a diszulfidkötésekre. Az adatok százszoros extinkcióértékben vannak feltüntetve

(1) Vizsgált anyag	(2) Reakcióidő		
	10'	3 óra	24 óra
1 gamma —SH .....	10,5	10,5	10,3
2 gamma —SH .....	18,2	18,5	17,5
3 gamma —SH .....	26,0	27,0	23,8
4 gamma —SH .....	34,0	35,0	28,8
5 gamma —SH .....	41,6	42,0	33,6
1 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	0,0	0,2	0,6
5 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	0,0	0,5	0,8
10 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	1,6	1,8	2,2
20 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	3,6	6,5	9,4
100 gamma —SH-nak megfelelő cisztin .....	4,8	13,0	27,2

## Más kötésben jelenlevő kén zavaró hatásának vizsgálata

A tioéter-csoport hidrolízise megfordítható folyamatban zajlik le és a megfordítható reakciók egyensúlya befolyásolható a tömeghatás törvénye alapján. Ezért megpróbáltam a tioéter-kötés hidrolízisét visszaszorítani a kelet-

kező termékek koncentrációjának mesterséges növelésével. Amint az alábbi egyenlet szemlélteti, a hidrolízis végbemenetele esetén szabad —SH-gyök és valamilyen alkohol keletkezik.



A folyamat tehát az alsó nyíl irányában tolódik el, akár a szabad —SH-t növelem cisztein-formában adagolva, akár alkoholt adagolok a rendszerbe. Hogy tényleg így játszódik le a folyamat, azt igazolja, hogy normál körülmények között 10 gamma —SH-nak megfelelő mennyiségű metionin a reakció folyamán 3,6 gamma —SH-ként és 20 gamma —SH-nak megfelelő metionin 6,0 gamma —SH-ként viselkedik. Előzetesen hozzáadott 5 gamma —SH hatására ugyanezek 2,6 gamma és 3,5 gamma —SH-nak megfelelő értéket mutatnak a reakció folyamán. A metilalkoholnak hasonló hatása van. 1 ml metanol jelenlétében a reakcióelegyben a 10 gamma —SH-nak megfelelő metionin hatását 3,6-ról 3,3-re és 20 gamma —SH-nak megfelelő metionin hatását 6,0-ról 5,28 gamma —SH-nak megfelelő értékre csökkenti. Etilalkohol használata azért nem előnyös, mert tapasztalatom szerint erősebb a fehérjekicsapó hatása, mint a metilalkoholnak.

Sajnos sem az —SH, sem az alkoholkoncentráció mesterséges növelése nem jár teljes eredménnyel, viszonylag kisebb a metionin részvétele a reakcióban, de még így is elég lényeges. Ezért megpróbáltam együttesen alkalmazni a cisztein és metanol adagolást. Ezt szemlélteti az 5. táblázat. A vizsgált oldatok összetétele az 5/a. táblázat esetén: 2,0 ml vizsgálandó oldat + 0,5 ml (5 gamma —SH) ciszteinoldat + 1,5 ml metanol + 4 ml 0,02%-os jégecetes jódooldat. A vizsgált oldatok összetétele az 5/b. táblázat esetén: 1,5 ml vizsgálandó oldat + 0,5 ml (5 gamma —SH) ciszteinoldat + 2 ml metanol + 4 ml 0,02%-os jégecetes jódooldat.

Jól látható, hogy 5 gamma —SH és 2 ml metanol együttes jelenléte annyira visszazorítja a metionin hatását, hogy a 100 gamma —SH-val egyenértékű metionin egy órával a reagensek összeöntése után is csak 2 gamma —SH-val azonos értéket mutat, míg a 100 gamma —SH-val egyenértékű cisztin — 1,5 ml metanol és 5 gamma —SH mellett is — mindössze 0,7 gamma —SH-val azonos nagyságot ér el. A metionin tehát 1/50-ed részben, a cisztin pedig csak 1/140-ed részben vesz részt a reakcióban. Ez azt jelenti, hogy gyakorlatilag sem a cisztin, sem a metionin nem zavarja a szabad —SH-gyök meghatározását.

Sajnos mégsem használható a fenti formában a módszer, mivel a viszonylag nagy mennyiségű metanol kicsapja a fehérjéket. Másrészt az 5 gamma —SH-felesleg adagolása a mérési pontosság rovására megy. Ezért megelégedtem a 2 gamma —SH-fölösleggel és mindössze 0,5 ml metanol használatával. Biztonság kedvéért még ezt is jégecet mellett adagoltam, nehogy opalizálás forduljon elő. A vizsgálandó liszt kivonat mennyiségét is leszorítottam 1 ml 5%-os kivonatra (5 g liszt + 100 ml deszt. víz egy órán át rázógépen rázatva, majd centrifugálva) ugyanilyen okok miatt.

#### Liszt kivonat —SH-tartalma meghatározásának menete

1 ml (5%-os) liszt kivonathoz hozzáadunk 2 gamma —SH-t, majd annyi vizet, hogy a térfogat 3 ml-re egészüljön ki. Ehhez hozzáadunk 1 ml 1 : 1 arányú jégecet—metanol keveréket, végül hozzáadunk 4 ml 0,02%-os jégecetben

## 5. táblázat

## Előzetesen adagolt cisztein és metanol együttes hatása a tioéter-kötésre

(1) Vizsgált anyag	(2) Extinkció · 100			(3) Gamma -SH-val egyen- értékű		
	Reakcióidő					
	30'	60'	90'	30'	60'	90'
<i>a)</i>						
5 gamma -SH .....	52,5	52,5	49,5			
7,5 gamma -SH .....	68,0	67,5	65,0			
10 gamma -SH .....	77,0	76,0	73,5			
5 gamma -SH + 20 gamma -SH-nak meg- felelő cisztin .....	53,0	53,6	50,5	0,1	0,2	0,2
5 gamma -SH + 100 gamma -SH-nak megfelelő cisztin .....	55,2	57,0	54,0	0,4	0,7	0,7
5 gamma -SH + 5 gamma -SH-nak meg- felelő metionin .....	56,5	57,2	55,8	0,6	0,75	0,8
5 gamma -SH + 10 gamma -SH-nak meg- felelő metionin .....	58,0	59,0	57,8	0,8	1,0	1,25
5 gamma -SH + 20 gamma -SH-nak meg- felelő metionin .....	60,2	61,3	60,5	1,2	1,3	1,75
<i>b)</i>						
5 gamma -SH .....	57,0	55,3				
7,5 gamma -SH .....	73,2	71,5				
10 gamma -SH .....	82,0	80,0				
5 gamma -SH + 100 gamma -SH-nak megfelelő metionin .....	67,3	67,3		1,6	1,8	
5 gamma -SH + 100 gamma -SH-nak megfelelő metionin .....	67,3	68,3		1,6	2,0	

oldott jódot. (Ez utóbbit célszerű 1%-os jégecetes jódoldatból hígítással készíteni.) A vakérték, melyhez viszonyítva mérünk 3 ml deszt. vizet, 1 ml jégecet—metanol (1 : 1) keveréket és 4 ml 0,02%-os jégecetes jódoldatot tartalmaz. A standardsorozat készítésekor a megfelelő mennyiségű ciszteinoldatot bemérve deszt. vízzel 3 ml-re egészítjük ki, hozzáadjuk az 1 ml-nyi jégecet—metanol keveréket és a 4 ml 0,02%-os jódoldatot. Végül a vakértékhez viszonyítva mindegyik kémcső tartalmát fotométeren lemérjük. Mivel Pulfrich-fotométer állt rendelkezésemre, ezért az oldat mennyiségét is ennek megfelelően alakítottam ki. A Pulfrich-fotométerhez tartozó 2 cm hosszúságú küvetát használtam, 1-es színszűrő mellett (420 nm) végeztem a leolvasást. A fenti módon megvizsgáltam kilenc szabványosított lisztminta -SH-tartalmát. Ezt tünteti fel a 6. táblázat. A meghatározásnál az értékek leolvasása 1,5 órával a reagensek összeöntése után történt. A vizsgálandó lisztkivonat 5 g lisztből 100 ml deszt. vízzel 1 óráig történő rázatással készült. A lisztszuspenziót percenként 8000 fordulattal centrifugáltam és a tiszta oldatot használtam fel vizsgálatra. A táblázat adatai két párhuzamos minta átlagértékét tüntetik fel.

A 6. táblázatban szereplő 9 darab szabványminőségű liszt jellegminta az 1963. évre kibocsátott etalonminták része. Jelölésként a jellegmintákon olvasható szabványjeleket használtam, melyek utalnak arra, hogy milyen növényből készült és hány százalék hamutartalommal rendelkezik az illető liszt.



## 6. táblázat

## Szabványminőségű lisztminták oldható fehérjéinek szabad —SH-csoport tartalma

(1) Vizsgált anyag	(2) Észlelt —SH. 10 <sup>-6</sup> g	(3) g —SH/10 <sup>6</sup> g liszt
1 ml BL 51 kivonat .....	1,085	21,7
1 ml BL 55 kivonat .....	1,135	22,7
1 ml BF 53 kivonat .....	1,125	22,5
1 ml BFF 55 kivonat .....	1,220	24,4
1 ml BL 112 kivonat .....	1,775	35,5
1 ml BL 160 kivonat .....	2,430	48,6
1 ml BL 225 kivonat .....	2,420	48,4
1 ml RL 90 kivonat .....	2,110	42,2
1 ml RL 125 kivonat .....	2,270	45,4
100 gamma —SH-val egyenértékű cisztein .....	0,480	
100 gamma —SH-val egyenértékű metionin .....	5,100	

## Következtetések

Az irodalmilag elfogadott és viszonylag gyakran használt —SH meghatározási módszerekkel kapott értékek között néha harmincszoros eltérés is tapasztalható. Így pl. LARSEN, JENNES és GEDDES [22] cikkében utal arra, hogy ugyanazon tejben az —SH mennyiségét ciszteinben kifejezve tiamin-diszulfidos módszerrel 0,02%-ot, ferricianidos módszerrel 0,09%-ot, míg *o*-jodozobenzoesavval 0,63%-ot mérhetünk. Ezen nagy eltérések egyik magyarázata az —SH-gyökök térbeli árnyékolttsága. Erre utal az is, hogy az említett tej —SH mennyisége (szintén cisztein %-ban kifejezve) hődenaturálás hatására tiamin-diszulfidos módszerrel mérve 0,2%-ra, ferricianidos meghatározást használva 0,34%-ra, míg *o*-jodozobenzoesavat használva 0,68%-ra nő. Ha csak a térbeli árnyékolttság játszana szerepet, akkor a denaturálódott fehérje —SH-tartalmának mérésekor a különböző metódusoknak közel egyező értéket kellene adniok, hiszen a denaturálódás folyamán a térbeli árnyékolttság gyakorlatilag megszűnik.

Az amerikai szerzők műveiben nem találok olyan gondolattal, mely a más elrendezésben jelenlevő kén hatására utalt volna. Eggedül a diszulfid-csoportok esetleges hatásáról tesznek említést, de itt is csak feltevés formájában. Tapasztalatom szerint nem is a diszulfidszerű elrendezésben jelenlevő kén, hanem a tioéter, vagy ticéterszerű kötésben előforduló kén okoz problémát. Már a szerves kémia tankönyvek is több laza, könnyen bomló kén kötésről tesznek említést. Így pl. BRUCKNER [7] szerint a szulfhidrilgyökök tiolészter, tioaminéter, tiazolingyűrűs alak, diszulfid-kötés és tioéter kötés formában mint könnyen bomló, laza kapcsolódásban vehetnek részt.

Az egyes módszerek közötti nagy értékkülönbség szerintem azzal magyarázható, hogy a nagyobb adatokat mutató módszerek részben mérik az ilyen laza formában kötött —SH-t is. Az egyes kötésmódok annyira lazák, hogy az átmenetet alig lehet nyomon követni. Mivel megfordítható reakciókról van szó, ha valamilyen módon — pl. a meghatározást végző reagenssel — csökkentjük a szabad —SH mennyiségét, valószínű, hogy azonnal megindul a laza kötések hidrolízise, a tömeghatás törvénye értelmében.

Ezt a tényt igazolja a 6. és 7. táblázat összehasonlítása is. A 7. táblázat adatai az előzővel azonos kilenc lisztminta kivonatának látszólagos  $-SH$ -tartalmát tüntetik fel. A meghatározás folyamán úgy jártam el, hogy a vizsgálandó és standard mennyiségeket is 4 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel és hozzájuk adtam 4–4 ml 0,02%-os jégecetes jódoidotot, majd a vakhoz viszonyítva 420 nm-en fotometráltam. Az értékek leolvasása 1,5 órával a reagensek összeöntése után történt. A vizsgálandó lisztkivonat 5 g lisztből 100 ml desztillált vízzel 1 óráig történő rázatással készült. A lisztszuspenziót 8000 fordulattal centrifugáltam és a kapott tiszta oldatot használtam fel vizsgálatra. A táblázat adatai két párhuzamos minta átlagértékeit tüntetik fel.

## 7. táblázat

Szabványminőségű lisztminták oldható fehérjének látszólagos  $-SH$ -csoport-tartalma

(1) Vizsgált anyag	(2) Észlelt $-SH \cdot 10^{-6}$ g	(3) g $-SH/10^6$ g liszt
1 ml BL 51 kivonat .....	2,850	57,0
1 ml BL 55 kivonat .....	3,075	61,5
1 ml BF 53 kivonat .....	3,000	60,0
1 ml BFF 55 kivonat .....	3,150	63,0
1 ml BL 112 kivonat .....	4,275	85,5
1 ml BL 160 kivonat .....	5,800	116,0
1 ml BL 225 kivonat .....	5,675	113,5
1 ml RL 90 kivonat .....	4,425	88,5
1 ml RL 125 kivonat .....	4,700	94,0

A 7. táblázat értékei tehát pusztán abban különböznek az előzőtől, hogy itt nem adtam minden egyes kémcsőhöz azonos cisztein és metanol mennyiséget. Vagyis itt nem szorítottam vissza a más kötésben jelenlevő kén hidrolízist. A 6. táblázat értékei 21,7 és 48,6 gamma  $-SH/g$  lisztmennyiség között változtak, a 7. táblázat adatai 57,0 és 116,0 gamma  $-SH/g$  lisztmennyiség között. A 6. táblázat adatai a 7. táblázat adatainak — búzaliszt esetében — 37–42%-ai. Ez bizonyítja, hogy csak hidrolízis visszaszorításáról van szó, mert ha más, nem kéntartalmú anyag okozná az adatok növekedését, akkor az nem lenne arányos. Hiszen nagyon valószínűtlen, hogy mind a hét búza lisztmintában a zavaró anyag mennyisége az  $-SH$ -tartalommal legyen arányos.

Mind a 6., mind a 7. táblázat azt szemlélteti, hogy a liszt minőségével fordított arányban változik az  $-SH$ -tartalom. Látható, hogy a közölt recept (6. táblázat adatai) szerint mérve a szulfhidril mennyiséget a metionin-tartalom 1/20-ad részben zavar, mert a 100 gamma  $-SH$ -val egyenértékű metionint kb. 5,1 gamma  $-SH$ -nak méri a módszer, míg a 100 gamma  $-SH$ -nak megfelelő cisztint mindössze 0,48 gamma  $-SH$ -nak méri. Vagyis a diszulfid-kötések egyáltalán nem, a tioéterszerű kötések elhanyagolható módon vesznek részt a reakcióban. Ha tényleg jelentős szerepe van a szabad  $-SH$ -nak a tézta kelesztése folyamán végbemenő biokémiai folyamatokban, akkor ebben a tioéters-csoportok — éppen a reakció megfordíthatósága miatt — legalább ilyen vagy még nagyobb mértékben szerepet kapnak. Tehát voltaképpen nincs értelme a szabad  $-SH$ -tartalom abszolút értékének mérésére törekedni. Sőt az

előző megfontolások alapján valószínűnek látszik, hogy nincs is abszolút értelemben vett —SH-koncentráció, mivel a szabaddá váló —SH-gyök mennyiségét mindig a reakció körülményei szabják meg.

### Ö s s z e f o g l a l á s

Az új meghatározás alapja a jodidionnak elemi jód feleslegében észlelt fényabszorpciója. Az abszorpció maximuma 366 nm körül van, de jól mérhető 420 nm-en is. Vizsgálendő lisztkivonathoz fölös elemi jódot adva, ennek egy része a szulfhidril-gyök hatására jodidionná alakul, melynek mennyisége fotometriásan meghatározható. Ilyen körülmények között azonban még jelentősen zavar a tioéter és diszulfid kötésmód. Ha a vizsgálendő anyaghoz ismert mennyiségben ciszteint és metanolt adunk, akkor gyakorlatilag már csak a szabad szulfhidril-tartalmat mérjük, mert a más kötésmódban — főleg tioéter és diszulfid formában — jelenlevő kén bomlása szabad —SH-ra egészen visszaszorol.

A vizsgálatok során szerzett tapasztalat szerint az —SH-gyök abszolút mennyisége nem mérhető, mert a reakció körülményei szabják meg a más kötésmódból szabaddá váló —SH mennyiségének mérését. Nincs is értelme az abszolút mennyiség mérésére törekedni, mert a tészta kelesztése során a végbe-menő biokémiai reakciók szulfhidril-gyök fogyasztása szabja meg — a tömeghatás törvénye alapján — a más kötésből keletkező szabad —SH-mennyiséget.

Mivel a vizsgálendő anyag lisztkivonat, ezért jelentős mennyiségű jodidion vagy más szervesetlen redukáló anyag zavaró hatásától nem kell tartanunk. A cukrok és az aminogyök még akkor sem zavarják a meghatározást, ha a vizsgálendőban előforduló mennyiségnél egy nagyságrenddel nagyobb töménységben vannak jelen.

*Érkezett : 1964. május 16.*

### I r o d a l o m

- [1] ANSON, M. L.: The reactions of denaturated egg albumin with ferricyanide. *J. Gen. Physiol.* **23.** 247—261. 1939.
- [2] BAKER, J. C., PARKER, N. K. & MIZE, M. D.: The action of oxidizing agents on sulfhydryl compounds in dough. *Cereal Chem.* **21.** 97—107. 1944.
- [3] BENESH, R. E., LARDY, H. A. & BENESH, R.: The sulfhydryl groups of crystalline proteins. *J. Biol. Chem.* **216.** 663—676. 1955.
- [4] BRDICKA, R.: Polarographic studies with dropping mercury kathode. Part. XXXI. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **5.** 112—128. 1933
- [5] BRDICKA, R.: Polarographic studies with dropping mercury kathode. Part. XXXII. Activation of hydrogen in sulfhydryl group of some thioacids in cobalt salt solutions. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **5.** 148—164. 1933.
- [6] BRDICKA, R.: Polarographic studies with dropping mercury kathode. Part. XXXIII. The microdetermination of cysteine and cystine in the hydrolysates of proteins, and the course of the protein decomposition. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **5.** 238—252. 1933.
- [7] BRUCKNER, GY.: *Szerves kémia I.* Tankönyvkiadó. Budapest. 1953.
- [8] DE LANGE, P. & HINTZER, H. M. R.: Studies on wheat proteins I. *Cereal Chem.* **32.** 307—313. 1955.

- [9] EDELHOCH, H., KATCHALSKI, E., MAYBURY, R. N., HUGHES, W. & EDSALL, J. T.: Dimerization of serum mercaptalbumin in presence of mercurials I. Kinetic and equilibrium studies with mercuric salts. *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 5058. 1953.
- [10] EDSALL, J. T., GREENSTEIN, J. P. & MEHL, J. W.: Sulfhydryl groups as estimated by porphyrindin titration. *J. Amer. Chem. Soc.* **61**, 1613. 1939.
- [11] GREENSTEIN, J. P. & EDSALL, J. T.: Sulfhydryl groups as estimated by porphyrindin titration. *J. Amer. Chem. Soc.* **62**, 1940.
- [12] HARLAND, H. A., COULTER, S. T. & JENNES, R.: Some factors influencing the reducing systems in dry whole milk. *J. Dairy Sci.* **32**, 334–344. 1949.
- [13] HELLERMANN, L., CHINARD, F. P. & RAMSDELL, P. A.: o-Iodosobenzoic acid a reagent for the estimation of cysteine glutathione, and the substituent sulfhydryl groups of certain proteins. *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 2551–2553. 1941.
- [14] HELLERMANN, L.: Reversible processes in the control of activity of certain enzymes. With a preliminary note on the oxidation of urease by porphyrindine. *Cold. Spring Harbor Symposia Quant. Biol. J.* **7**, 165–173. 1939.
- [15] HOLME, J. & SPENCER, E. Y.: Studies on some aspects of flour improvement. *Cereal Chem.* **29**, 251–261. 1952.
- [16] JÖRGENSEN, H.: Ein Beitrag zur Beleuchtung der hemmenden Wirkung von Oxidationsmitteln auf proteolytische Enzymfähigkeit. Über die Natur der Einwirkung von Kaliumbromat und analogen Stoffen auf die Backfähigkeit des Weizenmehles I. *Biochem. Z.* **280**, 1–37. 1935.
- [17] JÖRGENSEN, H.: Studies on the nature of bromate effect. Munksgaard, Copenhagen. 1945.
- [18] KOLTHOFF, J. M., ANASTASI, ADA & TAN, B. H.: Reactivity of sulfhydryl and disulfide in proteins II. Reactive disulfide as related to viscosity and optical rotation in denaturated bovine serum albumin. *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 3235–3240. 1958.
- [19] KOLTHOFF, J. M., STRICKS, W. & MORREN, L.: Amperometric mercurimetric titration of sulfhydryl groups in biologically important substances. *Anal. Chem.* **26**, 365–372. 1954.
- [20] KONG, R. W., MECHAM, D. K. & PENCE, J. W.: Sulfhydryl Groups in Wheat Flour. *Cereal Chem.* **34**, 201–211. 1957.
- [21] LAITINEN, H. A. & SULLIVAN, B.: The application of the dropping mercury electrode to the study of oxidation-reduction systems in flour. *Cereal Chem.* **18**, 60–73. 1941.
- [22] LARSEN, R. A., JENNES, R. & GEDDES, W. F.: Effect of heat treatment on the sulfhydryl groups of milk serum proteins. *Cereal Chem.* **26**, 287–297. 1949.
- [23] LUSENA, C. V.: Preparation of dried native wheat gluten. *Cereal Chem.* **27**, 167–178. 1950.
- [24] MACDONELL, L. R., SILVA, R. B., & FEENEY, R. E.: The sulfhydryl groups of ovalbumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **32**, 288–299. 1951.
- [25] MANGELS, C. E. & MARTIN, J. J.: Peptisation of wheat flour proteins by organic acids. *Cereal Chem.* **12**, 149–157. 1935.
- [26] MATSUMOTO, H. & HLYUKA, I.: Some aspects of the sulfhydryl-disulfide system in flour and dough. *Cereal Chem.* **36**, 513–521. 1959.
- [27] MATSUMOTO, H., OSHIMA, I. & HLYUKA, I.: Effect of bisulfite and acetaldehyde on the disulfide linkage in wheat protein. *Cereal Chem.* **37**, 710–720. 1960.
- [28] NORDIN, P. & SPENCER, E. Y.: Determination of sulfhydryl groups in flour by means of o-iodosobenzoate and radioactive iodine. *Cereal Chem.* **29**, 29–39. 1952.
- [29] PECZNIK, J.: A mezőgazdasági termények tárolása és technológiája. Kézirat gyűjtemény. Gödöllő. 1954.
- [30] ROSNER, L.: The reaction between iodacetic acid and denaturated egg albumin. *J. Biol. Chem.* **132**, 657–662. 1940.
- [31] SOKOL, H. A., MECHAM, D. K. & PENCE, J. W.: Observation on the reactivity of sulfhydryl groups in wheat flour. *Cereal Chem.* **37**, 151–158. 1960.
- [32] TURNER, J. M. & HAPPOLD, F. C.: Effect sulfhydryl group reagents on tryptophanase activity. *Nature*. **185**, 763–764. 1960.

## Новый метод определения содержания сульфгидрила в вытяжках из муки

А. НОСТИЦИУС

Кафедра химии и почвоведения ВУЗа аграрных наук, Моношмадьярвар (Венгрия)

### Резюме

Новый метод основан на световой адсорбции иона пода  $J^-$  в присутствии избытка элементарного пода. Максимум адсорбции наблюдается при значении около 366  $m\mu$ , но удовлетворительные результаты получаются и при значении 420  $m\mu$  (см. табл. № 1). В избытке элементарного пода величина адсорбции определяется только количеством ионов пода. Если к 1 мл. вытяжки из муки (5%), доведенной дистиллированной водой до 4 мл., прибавим 4 мл. 0,02% раствора пода, растворенного в 4 мл. ледяного уксуса, то соответственно количеству присутствующих гидрильных групп, часть элементарного пода восстанавливается. Количество возникших ионов пода можно измерить с помощью фотометра. При этом большую помеху оказывают присутствующие соединения серы, в которых сера находится в иных типах связи, главным образом тиоэфирных и дисульфидных (таблицы 3 и 4). Но если к исследуемому веществу добавим смесь 2  $\gamma$  — SH — и 1 мл. метанола-ледяного уксуса и все это разбавим водой до 4 мл, затем добавим 4 мл. 0,02% пода, растворенного в ледяном уксусе, тогда гидролиз тиоэфирных соединений настолько уменьшается, что только 1/50 часть их может оказывать мешающее влияние, а из дисульфидных групп может оказывать помеху только 1/100 часть их. (табл. 5).

На основании определений, проведенных в присутствии цистейна, цистина и метионина абсолютное содержание сульфгидрильных групп определить нельзя, т.к. количество освобождающихся сульфгидрильных групп — по закону действующих масс — всегда определяется условиями, при которых проходит реакция. По мнению автора не имеет смысла добиваться определения абсолютных количеств сульфгидрильных групп, т.к. на равновесие между серой сульфгидрильных групп и серой в иных формах связи влияют биохимические процессы, происходящие при брожении теста. Сравнение приводимых в таблицах 6 и 7 данных показывает, что количество сульфгидрила в вытяжках из муки существенно снижается, в случае если не даётся возможность к образованию свободных сульфгидрильных групп из других соединений серы.

Поскольку измеряемое вещество является вытяжкой из муки, не надо опасаться мешающих влияний ионов пода или других неорганических восстановительных веществ. Сахара и аминные группы не мешают определению даже если они находятся в количествах больших, чем в исследуемом веществе.

*Табл. 1.* Изменение величин адсорбции системы иодид — иод в зависимости от длины световых волн. (В таблице приведены величины экстинкции). (1) Длина световых волн в  $m\mu$ . (2) Экстинкция.

*Табл. 2.* Изучение мешающего влияния сахаров и крахмала. (1) Исследуемое вещество. (2) Экстинкция. X 100.

*Табл. 3.* Изменение содержания цистейна и метионина в зависимости от времени протекания реакции. (время отсчитывается от момента сливания реагентов). Данные отнесены к стократной величине экстинкции. (1) Исследуемое вещество. (2) Время прохождения реакции.

*Табл. 4.* Влияние относительно разбавленного раствора пода (0,02%) на дисульфидные связи. Данные отнесены к стократной величине экстинкции. (1) Исследуемое вещество. (2) Время прохождения реакции.

*Табл. 5.* Совместное влияние предварительно добавленного цистейна и метанола на тиоэфирные связи. (1) Исследуемое вещество. (2) Экстинкция X 100. (3) Равноценно гамме—SH.

*Табл. 6.* Содержание свободных групп SH в растворимых белках образцов муки стандартного качества.

*Табл. 7.* Содержание фиктивных SH-групп в растворимых белках образцов муки стандартного качества.

## A New Method to Determine the Sulfhydryl Content of Flour Extracts I

### A. NOSTICZIUS

College of Agricultural Sciences, Department of Chemistry and Soil Science, Mosonmagyaróvár (Hungary)

#### Summary

The new determination is based on the light absorption observed in the elementary iodine surplus of  $J^-$ . The maximum of absorption is at a value of about 366 nm but it is well utilizable even at 420 nm (see Table 1). In the case of iodine surplus the magnitude of the absorption is only influenced by the amount of iodine ions. If to 1 ml 5 per cent flour extract made up with distilled water to 4 ml, 4 ml 0,02 per cent iodic solution dissolved in glacial acetic acid is added, part of the elementary iodine is reduced to iodine ion in a measure corresponding to the amount of the present sulfhydryl radicle. The amount of iodine ion developed can be measured with photometer. Under such conditions, however, the sulphuric compounds present in other bonds, chiefly the thioether and disulphide type of bond (see Table 3 and 4) are still rather strongly disturbing. But if to the material to be examined  $2\gamma - SH$  and 1 ml glacial acetic acid — methanol mixture is added and this is diluted with distilled water to 4 ml and subsequently 4 ml 0,02 per cent glacial acetic acid iodine solution is added, then the hydrolysis of the thioether form is so much repressed that it disturbs only to  $1/50$  part while the disulphide form to  $1/140$  part (see Table 5).

On the basis of experiments carried out in the presence of cystein, cystin and methionine it seems probable that the absolute value of the sulfhydryl radicle can not be measured because — according to the law of mass effect — the amount of  $-SH$  radicles released is always determined by the conditions of the reaction. In the author's opinion there is no point about it to aim at the measuring of the absolute quantity since the equilibrium of free  $-SH$  and sulphur present in other kinds of bonds is influenced by biochemical reactions occurring at the raising of the doughs. A comparison of the data of Tables 6 and 7. illustrates that in the case of flour extracts the amount of measured  $-SH$  substantially decreases if the decomposition to free  $-SH$  of the sulphur in other bonds is repressed.

Since the substance to be measured is a flour extract, the disturbing effect of a substantial amount of iodine ion or of other inorganic reducing substance is not to be feared. The sugars (see Table 2) and the amino radicle do not disturb even if the concentration of the amount occurring in the material to be examined is higher by an order of magnitude.

*Table 1.* The change of the absorption value of the iodide-iodine system as a function of the wave length of the light (the Table contains extinction values). (1) Wave-length of light mm. (2) Extinction.

*Table 2.* Examination of the disturbing effect of starch or sugars. (1) Material examined. (2) Extinction  $100 \times$ .

*Table 3.* The change of the cystein and methionine values as a function of reaction time reckoned from the mixing of the reagents. Data are indicated in  $100 \times$  extinction value. (1) Material examined (2) Reaction time.

*Table 4.* Disulphide bonds as affected by comparatively thin — 0,02 per cent — iodic solution. Data are indicated in  $100 \times$  extinction value. (1) Material examined. (2) Reaction time.

*Table 5.* Combined effect on the thioether bond of previously added cystein and methanol. (1) Material examined. (2) Extinction  $100 \times$ . (3) Equivalent with  $\gamma-SH$ .

*Table 6.* Free  $-SH$  group content in the soluble proteins of standard quality flour samples.

*Table 7.* Apparent  $-SH$ -group content in the soluble proteins of standard quality flour samples.