



DESCHWANDEN<sup>1</sup>, ferner J. THOMANN<sup>2</sup> zur therapeutischen Wirkung der Hefe in Beziehung. Hefe wird in der Therapie ja gegen verschiedene Krankheiten angewandt, ohne daß man die dabei beobachteten Heilerfolge immer hinreichend erklären kann. Bei Verabfolgung glutathionreicher Hefe in Rekrutenschulen beobachteten die genannten Forscher eine Steigerung des Glutathiongehalts des Blutes und damit der Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten.

So war ein Verfahren zur Ermittlung des Glutathiongehaltes der medizinisch angewandten Hefen, sei es als Heilmittel oder als diätetisches Präparat, erwünscht. Das Verfahren soll hinreichend genau und auch einfach sein. Für die Ausarbeitung des Verfahrens standen zur Verfügung die Beobachtungen von W. C. HESS<sup>3</sup>, E. KLING, L. BAUMGARTNER u. I. H. PAGE<sup>4</sup>, MASON<sup>5</sup>, J. KÜHN<sup>6</sup>, E. BACH u. E. BACH<sup>7</sup>, M. DELAVILLE u. L. KOWARSKI<sup>8</sup>, R. WILLHEIM u. K. STERN<sup>9</sup>, G. E. WOODWARD u. E. G. FRY<sup>10</sup>, W. QUENSEL u. K. WACHHOLDER<sup>11</sup> und K. WACHHOLDER, K. ANDERS u. K. UHLENBROCK<sup>12</sup> bei der Bestimmung des Glutathion in Blut und Organen. Nach diesen Forschern ist die Verwendung von Kaliumferricyanid, das nach der Methode H. C. HAGEDORN u. B. N. JENSEN<sup>13</sup> zur Oxydimetrie von Zucker benutzt wird, bei der stark sauren Reaktion der zu titrierenden Glutathionlösung nicht brauchbar. Um eine Autoxydation des Glutathions zu verhindern, muß man ja in stark saurer Lösung arbeiten. Mit Hilfe der Säure lassen sich vorhandene Eiweißstoffe entfernen. Hierbei bewährte sich Sulfosalicylsäure, nicht z. B. Tri-

<sup>1</sup> Mitt. a. d. Gebiete d. Lebensmittelunters. u. Hyg. **24**, 1933, Heft 4—5; Schweiz. med. Wochenschr. **64**, 703 (1934).

<sup>2</sup> Verhandl. d. Schweiz. Naturf.-Ges. **1934**, 463.

<sup>3</sup> Journ. Washington Acad. Sciences **19**, 419 (1929); C. C. **1930**, I, 867.

<sup>4</sup> Biochem. Ztschr. **217**, 389 (1930).

<sup>5</sup> Journ. of biol. Chem. **86**, 623 (1930).

<sup>6</sup> Biochem. Ztschr. **230**, 353 (1931).

<sup>7</sup> Biochem. Ztschr. **236**, 174 (1931).

<sup>8</sup> Compt. rend. Soc. Biol. **106**, 1220 (1931); C. C. **1931**, II, 2362.

<sup>9</sup> Biochem. Ztschr. **260**, 180 (1933).

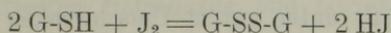
<sup>10</sup> Journ. of biol. Chem. **97**, 465 (1932); C. C. **1932**, II, 2997.

<sup>11</sup> Ztschr. physiol. Chem. **231**, 65 (1935).

<sup>12</sup> Ztschr. physiol. Chem. **233**, 181 (1935).

<sup>13</sup> Biochem. Ztschr. **135**, 46 (1923).

chloressigsäure. Gibt man zur Oxydation des Glutathions Jodlösung in Überschuß zu und titriert nach einiger Zeit den restlichen Jodanteil zurück, so ergibt sich dabei infolge weitgehenderer Oxydation ein größerer Jodverbrauch als bei direkter Titration mit Jodlösung; deshalb ist nur letztere anwendbar. Da Jodatlösung sich einfacher zubereiten läßt und besser haltbar ist als Jodlösung, ist Jodatlösung vorzuziehen. Man titriert direkt mit Jodatlösung bei Gegenwart von Jodid, Säure und Stärke. G-SH reagiert dabei mit dem durch das Jodat in Freiheit gesetzte Jod folgendermaßen:



Um das Gesamtglutathion zu ermitteln, reduziert man vor der Titration mit naszierendem Wasserstoff vollkommen zum G-SH. Aus der Differenz beider Titrationen läßt sich ursprünglich vorhandenes G-SS-G berechnen.

Voraussetzung für einen obiger Gleichung entsprechenden Jodverbrauch ist eine Glutathionkonzentration des Reaktionsgemisches von mindestens 6 mg%. Die untersuchten, bei 40° frischgetrockneten Bierhefen ergaben bei dem beschriebenen Verfahren stets höhere Konzentrationen. Ist der Glutathiongehalt der Hefe geringer, da die verwendete Hefe an sich weniger Glutathion enthält, oder ihr ursprünglicher Glutathiongehalt beim Trocknen oder während der Aufbewahrung absank, dann wäre anstatt der nachstehend vorgeschriebenen 1,0 g Trockenhefe z. B. 2 g von vornherein zu extrahieren, ohne daß dabei die Mengen der Extraktionsflüssigkeit und der Reagentien geändert werden.

Um Glutathion von anderen jodbindenden Substanzen zu unterscheiden, führt man noch eine besondere Titration aus, nachdem man das Glutathion mit Formaldehyd ausschied, der dabei gefundene Jodverbrauch ist von dem bei der Haupttitration gefundenen abzuziehen.

#### Ausführung der Bestimmung.

Aus 1,0 g feingepulverter Trockenhefe (genau gewogen) und 36 ccm Wasser (genau gemessen mit Bürette) bereitet man unter allmählichem Anrühren in einer Porzellanschale eine Suspension, mischt diese mit 4 ccm 22%iger wässriger Sulfosalicylsäurelösung

(genau gemessen mit Bürette) und läßt das Gemisch unter mehrfachem Umrühren eine halbe Stunde bedeckt stehen. Dann saugt man durch ein doppeltes Filter auf einer kleinen Nutsche (Durchmesser ca. 5 cm) scharf ab. Zweckmäßig feuchtet man das Filter vor dem Filtrieren der ganzen Suspension vorsichtig mit dieser an, damit nicht Hefeteile in das Filtrat übergehen. Von dem klaren und schwach gelb gefärbten Filtrat nimmt man 10 ccm mit der Pipette auf, gibt sie in einen Erlenmeyer von 50 ccm Inhalt, setzt dort 1 ccm 10%ige, frisch bereitete Jodkaliumlösung und 20 Tropfen 1%ige Stärkelösung, bereitet mit konzentrierter Kochsalzlösung, zu und läßt unter gutem Umschwenken dann sofort aus einer Mikrobürette n/1000 Kaliumjodatlösung zufließen, bis die schwach gelb gefärbte Flüssigkeit einen schwachen Umschlag nach rosa-violett zeigt. Gegen Ende der Titration verschwindet die rosa-violette Färbung langsam; daher ist vor der Beendigung durch einige Minuten langes Warten zu prüfen, ob die Färbung bestehen bleibt. Steht das Titriergefäß auf weißer Unterlage und vor einem weißen Hintergrund, so ist das Bestehenbleiben der rosa-violetten Färbung hinreichend genau zu beobachten. Nicht darf bis zum Auftreten der Blaufärbung der Stärke titriert werden.

Weitere mit der Pipette entnommene 10 ccm Filtrat versetzt man in einem Erlenmeyer von 50 ccm Inhalt mit 5 ccm 40%iger Schwefelsäure und Zinkspänen in solcher Menge, daß eine 2 Stunden lange Wasserstoffentwicklung stattfindet. Zweckmäßig ist der wiederholte Zusatz kleiner Anteile der Zinkspäne, sodaß auch nach zwei Stunden noch ungelöstes Zink vorhanden ist. Die Entwicklung von Wasserstoff muß hinreichend lebhaft sein, damit die Flüssigkeit dadurch dauernd leicht in Bewegung gehalten und das zu reduzierende Glutathion dauernd an den Entstehungsort des aktiven Wasserstoffs herangespült wird. Nach zwei Stunden gießt man die Flüssigkeit von dem noch nicht gelösten Zinkanteil durch ein kleines Filter in einen Erlenmeyer von 50 ccm Inhalt ab, wäscht Gefäß, Zink und Filter noch mit wenig Wasser wiederholt nach, und bestimmt sofort das Gesamt-Glutathion in der oben angegebenen Weise.

Zur Ermittlung der nicht dem Glutathion zukommenden Jodbindung ist in gleicher Weise ein Versuch mit 0,5 g Hefe (genau

gewogen) auszuführen, bei welchem anstatt 18 ccm Wasser 18 ccm einer Mischung von 1,0 ccm 35%iger Formaldehydlösung mit 100 ccm Wasser zur Herstellung des Hefeauszuges benutzt werden. Man zieht zuerst mit dieser Lösung eine halbe Stunde wie oben die Hefe aus, mischt hierauf 2 ccm 22%ige Sulfosalicylsäurelösung zu, läßt nochmals 15 Minuten stehen und verfährt weiter wie oben. Es sei darauf hingewiesen, daß bei einem Zufügen von Formaldehyd nach dem Zusatz der Sulfosalicylsäure und vor der Filtration die Ausscheidung des Glutathions nur mehr teilweise gelingt; gibt man Formaldehyd zu dem bereits mit Sulfosalicylsäure versetzten und filtrierten Hefeauszug und titriert dann, so findet überhaupt keine Ausscheidung des Glutathions für die Jodbindung mehr statt, d. h. man benötigt in diesem Falle bei der Titration dieselbe Menge Jodat wie ohne Formaldehyd. Deshalb ist in der angegebenen Reihenfolge zu verfahren.

Die sowohl für die direkt vorhandene G-SH-Form, wie für die nach der Reduktion vorhandene G-SH-Form, wie auch für die „Restjodbindung“ verbrauchten Jodatmengen beziehen sich stets auf 0,25 g Hefe. Man zieht den für die Restjodbindung verbrauchten Jodatanteil von den bei den ersten beiden Titrationen verbrauchten Jodatmengen ab und ermittelt aus den Differenzen die vorhandene G-SH-Form und das Gesamt-Glutathion, das ebenfalls als G-SH berechnet wird. Multipliziert man die jeweils gefundenen Differenzen mit 123 ( $= 0,307 \times 400$ ), so erhält man den mg%-Gehalt der Hefe an direkt in reduzierter Form vorhandenem Glutathion, bzw. Gesamt-Glutathion. Die Differenz beider Werte ergibt weiter den Gehalt an G-SS-G-Form, ausgedrückt durch die daraus erhältliche G-SH-Menge.

Die n/1000 Jodatlösung erhält man durch Verdünnen von n/100 Jodatlösung vor der Titration. Die n/100 Jodatlösung ist nach unseren Erfahrungen im geschlossenen Gefäß mehrere Monate unverändert haltbar. Man bereitet sie durch Lösen von 0,3567 g reinem KJO auf 1 Liter Wasser. 1 ccm n/1000 Jodatlösung entspricht 0,307 mg G-SH.

Für frische bei 40° getrocknete Bierhefe fanden wir nach Abzug der Restjodbindung durchschnittlich einen Verbrauch von 4—5 ccm Jodat für die in 10 ccm Hefeauszug vorhandene G-SH-Form, der Verbrauch an Jodat nach der Reduktion war nur wenig höher. Der

auf die Restjodbindung entfallende Jodatanteil war gering, er betrug bei unseren Versuchen 0,2—0,3 ccm, also weniger als 10% der Gesamtjodatmenge. Aus obigem Jodatverbrauch berechnet sich der Gehalt der frischen, bei 100° getrockneten Bierhefe an G-SH-Form zu 490 bis 615 mg%. Dies stimmt hinreichend überein mit dem von J. THOMANN<sup>14</sup> nach einer anderen Methode gefundenen Glutathionmittelwert von 450 mg% in bestrahlter Bierhefe. Bei längerem Lagern der Trockenhefe erfährt die G-SH-Form eine Oxydation und nimmt auch der Gesamt-Glutathiongehalt, allerdings in geringerem Maße ab. Dieser Übergang von G-SH in G-SS-G und die Abnahme des Gesamtglutathions verlaufen in verschiedenen Hefen ungleichmäßig rasch. Nach J. THOMANN beschleunigt der Feuchtigkeitsgehalt der Hefe diese Wertverminderung. In Preßhefe fand jener Autor z. B. nur 20—50 mg% Glutathion. Das Trocknen der Hefe bei 100° setzt ebenfalls deren Gehalt an Gesamtglutathion und an G-SH herab, und zwar den letzteren stärker, da G-SH dabei zum Teil in G-SS-G übergeht. In einer aus dem Handel bezogenen sog. Vitaminhefe fanden wir höchstens Spuren von Glutathion.

Diese Verschiedenheit des Glutathiongehaltes der Hefen macht die Ermittlung des Glutathiongehaltes in den in der Therapie benutzten Trockenhefen angezeigt. Seine Ermittlung läßt zugleich erkennen, ob die Hefe bei niederer Temperatur, wie es D. A.-B. VI für medizinische Hefe vorschreibt, getrocknet ist, ob sie sachgemäß lagerte und ob sie nicht zu sehr gealtert ist. Ein auffallend niederer Glutathiongehalt deutet auch eine Abnahme oder ein Verschwinden anderer therapeutisch wirksamer Inhaltsbestandteile der Hefe infolge unsachgemäßer Herstellung oder Aufbewahrung derselben an.

---

<sup>14</sup> Verhandl. d. Schweiz. Naturf.-Ges. 1934, 463.