



HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHEDE UIT DIE
BIBLIOTEK VERWYDER WORD NIE

BIBLIOTEK VERWYDER WORD NIE
GEEN OMSTANDIGHEDE UIT DIE
HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER

JOVS-SASOL-BIBLIOTEK 0090287



11109974110122000019

HOMOLITIESE EN HETEROLITIESE SPLITSINGSREAKSIES
VAN DISULFIEDBINDINGS

deur

Nicolaas Jacobus Janse van Rensburg (M.Sc.)

Proefskrif voorgelê ter vervulling van die
vereistes vir die graad Doctor Scientiae in
die Fakulteit van Natuurwetenskappe aan die
Universiteit van die Oranje-Vrystaat,
Bloemfontein.

Desember 1966.

HIERDIE ERSTEMLAAR KAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHEDE UIT DIE
BIBLIOTEEK VERWYDER WORD NIE

Universiteit van die Oranje-Vrystaat
BLOEMFONTEIN
16-5-1967
KLAS No. *Jan. op Ken*
No. 90287
BIBLIOTEEK

OPSOMMING

Hierdie verhandeling behels 'n ondersoek van enkele splitsingsreaksies van die disulfiedbinding.

'n Aantal onsimmetriese disulfiede van lae molekulêre gewig, asook onsimmetriese disulfiede gevorm tussen proteïene wat tiolgroepe bevat en tiole van lae molekulêre gewig, is berei deur middel van tiol-disulfied-uitruilingsreaksies. Die reaksie van sulfietione met bogenoemde onsimmetriese disulfiede is ondersoek. By meeste van die onsimmetriese disulfiede van lae molekulêre gewig toon sulfietione 'n groter affiniteit vir 'n spesifieke swaelatoom van die disulfiedbinding. Dit varieer van 'n geringe voorkeur tot 'n aanval wat feitlik uitsluitlik net op die een swaelatoom gerig is. Hierdie preferente aanval van sulfietione op 'n sekere swaelatoom word beheer deur stereochemiese faktore. Kwaÿternêre substitusie op β -koolstofatome veroorsaak groter steriese beskerming as tersiêre substitusie, terwyl laasgenoemde weer meer beskerming verleen as sekondêre substitusie. Die invloed van steriese verhinderings is so sterk dat dit die invloed van faktore soos polarisasie van die disulfiedbinding, coulombiese kragte of die stabiliteit van die verplaasde merkaptiedione oorheers. Hoewel albei die β -koolstofatome van die onsimmetriese disulfiede tussen proteïen-tiolgroepe en sisteïen tersiêr-gesubstitueer is, toon sulfietione nogtans dikwels 'n groter affiniteit vir die „sisteïen“-swaelatoom. Die „proteïen“-swaelatoom van die onsimmetriese disulfied geniet steriese beskerming as gevolg van die geordende ruimtelike rangskikking van die natuurlike proteïenmolekule. Na denaturering deur ureum is die sekondêre en tersiêre proteïenstruktuur vernietig en val sulfiet die disulfied sonder enige voorkeure aan.

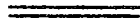
In die bepaling van alifatiese tiole met Ellman se reagens, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobensoësuur), (DTN), word onsimmetriese disulfiede in aansienlike hoeveelhede in die reaksiemengsel gevorm. So 'n onsimmetriese disulfied het feitlik dieselfde absorpsiespektrum as 5,5'-ditiobis-(2-nitrobensoësuur) en meng nie by die kolorimetriese bepaling van die gevormde 3-karboksi-4-nitrotiofenol in nie. Die gevormde onsimmetriese disulfiede is nie stabiel in alkaliese medium nie en ontbind om 3-karboksi-4-nitrotiofenol asook die ooreenkomstige alifatiese sulfien- en sulfoonsure te vorm. Ellman se reagens kan nie gebruik word om

tiolgroepe van natuurlike keratien te bepaal nie, maar wel na hidrolise. Deur keratienhidrolisate meganies te roer, kan die hidrolisetyd van 120 minute tot 45 minute verminder word. Onder hierdie kondisies gee die DTN-metode resultate wat in goeie ooreenstemming is met kontrolebepalings.

Die kwantumopbrengs van sisteïen by sistien-natriumphosfietoplossings wat met ultravioletlig (golflengte = 254 m μ) bestraal is, is onafhanklik van die konsentrasie van die sistien, maar neem toe met toenemende hipofosfietioonkonsentrasies.

Die reduksie van sistien deur hipofosfietione word geïnduseer deur 'n chemiese vry radikaalopwekker ($\text{Fe}^{++}/\text{H}_2\text{O}_2$). Dieselfde twee intermediêre reaksieprodukte, $(\text{H}_2\text{O}_2)\dot{\text{P}}\text{SR}$ en $[(\text{H}_2\text{O}_2)^+\text{PSR}]\bar{\text{S}}\text{R}$, wat by die lig-geïnduseerde reaksie gevorm word, word ook in hierdie geval gevorm. Hoewel dié reaksie maklik verloop, word kwantitatiewe reduksie nie verkry nie.

Die termies-geïnduseerde reduksie van sistien deur hipofosfietione verloop kwantitatief by pH 5.2, maar nie in 0.1 M HCl-medium of by pH 9.3 nie. Die induksietyd van bogenoemde reaksie word verminder deur toenemende hoeveelhede tiol by die reaksiemengsel te voeg.



I N H O U D S O P G A W E

ALGEMENE INLEIDING

<u>Hoofstuk</u>		<u>bl.</u>
I	<u>INLEIDING</u>	1
II	<u>DIE STEREOCHEMIE VAN DIE DISULFIED-BINDING</u>	3
III	<u>DIE STERKTE VAN DIE DISULFIEDBINDING</u>	8
IV	<u>MEGANISMES WAARVOLGENS DIE DISULFIED-BINDING GESPLITS KAN WORD</u>	11
	A. Homolitiese splitsing van die disulfiedbinding	
	(a) Monomolekulêre homolise	
	(i) Termiese homolise	12
	(ii) Fotolitiese dissosiasie	14
	(b) Bimolekulêre radikaalverplasingereaksies	16
	B. Nukleofiele splitsing van die disulfiedbinding	
	(a) Meganisme	18
	(b) Die relatiewe tiofiliteite van nukleofiele reagense	18
	(c) Stereochemiese invloede	21
V	<u>DIE REAKTIWITEIT VAN DISULFIEDBINDINGS IN PROTEÏENE</u>	24

DIE AGTERGROND VAN ENKELE SPLITSINGSREAKSIES VAN DIE DISULFIEDBINDING

VI	<u>DIE REAKSIE VAN SULFIETIONE MET DIE DISULFIEDBINDING</u>	
	A. Meganisme van die reaksie	28
	B. Stereochemiese invloede	30
	C. Splitsing van disulfiedgroepe in proteïene	31
VII	<u>TIOL-DISULFIEDUITRUILINGSREAKSIES</u>	
	A. Meganisme van die uitruiling	33
	B. Redokspotensiale van tiol/disulfiedsisteme	35
	C. Faktore wat reaksiesnelhede by tiol-disulfieduitruiling beïnvloed	38
	D. Verdere aspekte van tiol-disulfieduitruiling	42
	E. Enkele toepassings van tiol-disulfieduitruiling	43
	F. Die rol wat tiol-disulfieduitruiling en onsimmetriese disulfiede in proteïene speel	44

VIII	<u>SPLITSING VAN DIE DISULFIEDBINDING DEUR HIDROKSIELIONE</u>	49
IX	<u>DIE REDUKSIE VAN DISULFIEDBINDINGS DEUR HIPOFOSFIETIONE</u>	54
	<u><u>EKSPERIMENTEEL EN RESULTATE</u></u>	
X	<u>DIE SULFITOLISE VAN ONSIMMETRIESE DISULFIEDE</u>	
	(i) Sintese van onsimmetriese disulfiede	58
	(ii) Sulfitolise van onsimmetriese disulfiede	62
XI	<u>TIOL-DISULFIEDUITRUILING EN DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN TIOLE MET 5,5'-DITIOBIS-(2-NITRO- BENSOËSUUR) (DTN)</u>	
	(i) Die vorming en identifikasie van onsimmetriese disulfiede in die reaksie tussen DTN en tiole	70
	(ii) Faktore wat by die DTN-bepalings- metode van tiole inmeng	71
	(iii) Bepaling van die tiolinhoud van h onoplosbare proteïen met die DTN-metode	75
	(iv) Amperometriese kontrolebepaling van die DTN-metode	77
XII	<u>DIE REAKSIE VAN HIPOFOSFIETIONE MET SISTIEN</u>	
	(i) Die lig-geïnduseerde sistien/ hipofosfiet-reduksiereaksie	80
	(ii) Induksie van die sistien/hipo- fosfiet-reduksie deur radikaal- opwekkers van h chemiese aard	85
	(iii) Die termies-geïnduseerde sistien/ hipofosfiet-reduksiereaksie	86
	<u><u>BESPREKING</u></u>	
XIII	<u>DIE REAKSIE VAN SULFIETIONE MET ONSIMMETRIESE DISULFIEDE</u>	89
XIV	<u>TIOL-DISULFIEDUITRUILING EN DIE KWANTI- TATIEWE BEPALING VAN TIOLE MET 5,5'-DITIOBIS-(2-NITROBENSOËSUUR)</u>	101
XV	<u>DIE REDUKSIE VAN SISTIEN DEUR HIPOFOSFIETIONE</u>	107
	VERWYSINGS	114
	DANKBETUIGINGS	

BLADSYOPGAVE VIR FIGURE

<u>Figuur No.</u>	<u>Bladsy</u>	<u>Figuur No.</u>	<u>Bladsy</u>
I	59	XI	71
II	59	XII	73
III	60	XIII	76
IV	61	XIV	77
V	63	XV	80
VI	64	XVI	80
VII	67	XVII	82
VIII	67	XVIII	83
IX	70	XIX	86
X	71	XX	87

BLADSYOPGAVE VIR TABELLE

<u>Tabel No.</u>	<u>Bladsy</u>
I	66
II	68
III	69
IV	72
V	73
VI	77
VII	79
VIII	84
IX	85
X	87

I. INLEIDING

Die disulfiedbinding is een van die belangrikste kovalente bindings wat in chemiese verbindings voorkom. Dit besit 'n aantal unieke eienskappe wat veroorsaak dat dit nie slegs by organiese chemie 'n besondere rol speel nie, maar wat dit ook van kardinale belang in talle biochemiese prosesse maak.

Hierdie binding speel bv. 'n baie belangrike rol in die struktuur en funksie van proteïene. Die stabilisering van die sekondêre en tersiêre struktuur van proteïene deur disulfiedbindings is deur talle eksperimente bewys^{3,105,151}. Vernietiging van hierdie struktuur beïnvloed gewoonlik die funksie van die proteïen; so word daar bv. 'n verlies in biologiese aktiwiteit ondervind wanneer die disulfiedbindings van lisosiem¹⁸¹, pepsien³⁶, insulien⁸⁹ of ribonuklease³⁷⁷ gesplits word. Biochemiese prosesse soos die koagulering en denaturering van proteïene (bv. die gelvorming van eierwit-albumien) berus ook op die splitsing van die disulfiedbinding¹⁷⁰. Verder is dit bekend dat die taaiheid van beesvleis deur die disulfiedbindings in die miofibrille¹⁶² beïnvloed word. Die fisiologiese aktiwiteit van die laktogeen-hormoon¹³² word beheer deur disulfiedbindings, en selfs die klontvorming van bloedfibrinogeen²³² berus op die splitsing en vorming van disulfiedbindings. Daar word ook beweer²⁴³ dat mitose (seldeling) gepaard gaan met die splitsing van disulfiedbindings.

Selfs in die planteryk laat die disulfiedbinding sy invloed geld. Onlangs is bv. bewys dat dit een van die faktore is wat die weerstand van plante teen ryp en droogte bepaal¹⁴². Net so is die taaiheid van deeg 'n funksie van die aantal disulfiedbindings in die meel¹³⁵.

'n Verskynsel wat biochemici jare lank in die duister laat tas het, is die beskerming wat sekere disulfiede en tiole teen ioniserende straling verskaf^{10,11,271}. Hierdie beskermende effek is gevind by diere, laer vorms van lewe soos bakterieë, en selfs by proteïene. Die verklaring vir hierdie reaksie word gevind in die onsimmetriese disulfiede wat in al hierdie gevalle gevorm word en wat beskerming teen X-strale en γ -strale verleen⁹⁴⁻⁹⁹.

Die disulfiedbinding kan ook as die basis van die keratienchemie beskou word. Wol bevat 11% sistien, wat 'n

geweldige invloed op die fisiese en meganiese eienskappe van die vesel het. Bykans al die reaksies wat aangewend word om die fisiese eienskappe van wol te verander, het te doen met die disulfiedbinding. Dit sluit in krimpweringsprosesse, permanente setting, ens.⁴⁴. Splitsingsreaksies van disulfiedbindings wat industriële toepassing het, vind ons by kettingoordragreagense in polimerisasies¹⁵, vulkaniseringsversnellers¹⁹⁸ en selfs by sekere landbouchemikalië²²³.

Ten spyte van die feit dat die disulfiedbinding dikwels bestudeer is en daar veral op die gebied van die biochemie reeds 'n groot aantal publikasies hieroor verskyn het, bestaan daar nog talle onopgeloste probleme in hierdie veld. Hierdie verhandeling behels 'n ondersoek van enkele splitsingsreaksies van die disulfiedbinding en skrywer hoop dat die kennis wat met hierdie studie ingewin is, sal bydra tot die opklaring van sommige van die vraagstukke.

II. DIE STEREOCHEMIE VAN DIE DISULFIEDBINDING

Talle splitsings van die disulfiedbinding word beïnvloed deur stereochemiese faktore. 'n Goeie kennis van die stereochemie van hierdie binding is dus noodsaaklik.

A. Die rangskikking van die swaelatome in di- en polisulfiede

Die swaelatome in di- en polisulfiede kan teoreties in onvertakte (I) of vertakte (II) kettings voorkom.



Die feit dat disulfiede en polisulfiede redelik maklik swael vrystel, het daartoe gelei dat vir baie jare geglo is dat die vertakte struktuur II saam met struktuur I voorkom. Met behulp van moderne fisies-chemiese tegnieke wat o.a. ultraviolet-^{12,197,198,255}, infrarooi-³¹⁹ en Ramanspektroskopie^{112,113}, dipoolment-^{210,374,383} en diamagnetiese metings¹⁰⁷ en X-straal-^{363,385} en elektrondiffraksie studies^{86,339} insluit, is nou egter bewys dat die vertakte struktuur nie bestaan nie. Talle disulfiede en polisulfiede is ondersoek en in geen enkele geval is enige vertakking gevind nie. Die enigste gevalle waar die disulfiedbinding wel deels dubbelbindingkarakter toon, is by tiosulfaatione en polisulfiede as terminale ione²².

B. Bindingslengtes

S-S-bindingslengte:

Die bindingslengte tussen divalente swaelatome in di- en trisulfiede is taamlik konstant. Abrahams¹ gee die gemiddelde lengte van drie-en-veertig verbindings aan as 2.08 Å, wat presies ooreenstem met die waarde wat teoreties deur Pauling²⁷⁴ bereken is. Huggins¹⁶⁹ het bereken dat die lengte tussen 2.05 en 2.07 Å varieer.

C-S-bindingslengte:

Cox en Jeffrey⁷³ gee die C-S-bindingslengte aan as 1.812 Å wat ook die waarde is van die som van die Pauling kovalente strale van swael en koolstof²⁷⁴. Volgens berekenings van Huggins¹⁶⁹ het die C-S-bindingslengte 'n waarde van 1.83 Å, terwyl Abrahams¹ die lengte as 1.82 Å aangee.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHYSICS DEPARTMENT

PHYSICS 311

LECTURE 1

MECHANICS

1.1 Kinematics

1.2 Dynamics

1.3 Energy

1.4 Momentum

1.5 Angular Momentum

1.6 Oscillations

1.7 Waves

1.8 Relativity

1.9 Quantum Mechanics

1.10 Modern Physics

1.11 Special Topics

1.12 Final Exam

1.13 Appendix

1.14 Bibliography

1.15 Index

1.16 Glossary

1.17 Acknowledgments

1.18 Contact Information

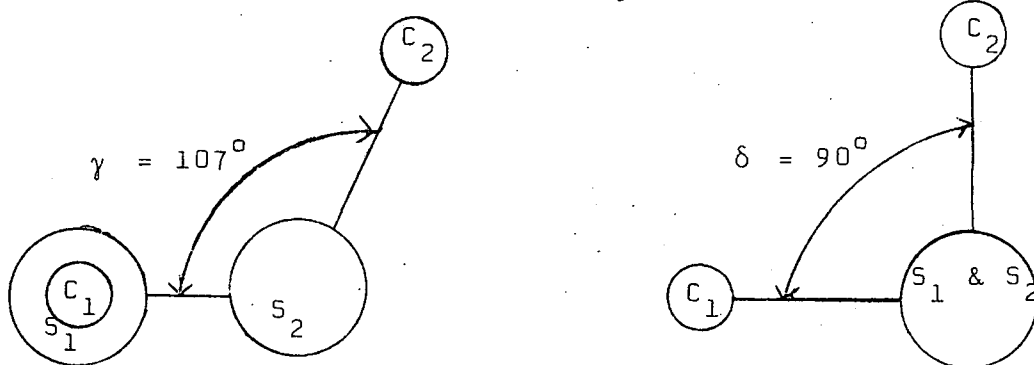
1.19 Copyright

1.20 Disclaimer

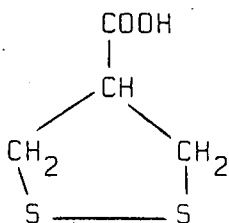
1.21 End of Document

C. Bindingshoeke:

Die S-S-C-bindingshoek (γ) varieer tussen 103° en 107° en die dihedriese hoek (δ) tussen die twee S-C-bindings²⁸ is ongeveer 90° . Die struktuur van 'n tipiese alifatiese disulfied (dimetioldisulfied) is volgens Scott^{321,322} en Calvin⁴⁶ die volgende:



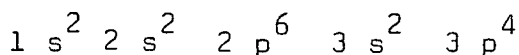
By disulfiedbindings wat 'n deel van 'n ringstruktuur vorm, is die dihedriese hoek kleiner as 90° . By 1,2-ditiolaan-4-karboksielsuur¹³¹ is dit bv. 26.6° :



Hierdie klein dihedriese hoek veroorsaak aansienlike spanning* in die ring. Weens die spanning wat in vyfledige disulfiedringe bestaan, toon verbindings van hierdie tipe, bv. lipoteiensuur (1,2-ditiolaan-3-valeriaansuur), 'n hoë reaktiwiteit²⁸⁵.

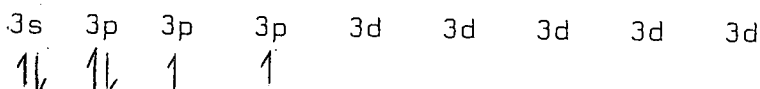
D. Die orbitale betrokke by die vorming van die disulfiedbinding

Die elektroniese konfigurasie van die vry element swael is die volgende⁸⁸:



* Daar bestaan nog 'n meningsverskil oor die grootte van die spanning in vyfledige ringe; sommige navorsers het beweer dat dit ongeveer 5 Kkal/mol is terwyl andere dit aangegee het as 25 Kkal/mol^{16,27,47,110,344}.

Die elektronkonfigurasie van die valensbaan van die vry swaelatoom is:



Die bindingshoeke by divalente swael kan dus ontstaan²⁸³ uit:

- (i) suiwer p-bindings .
- (ii) sp^3 -hibriedbindings
- (iii) bindings met d-karakter.

(i) Pauling²⁷² het beweer dat die σ -binding wat die twee swaelatome verbind, feitlik suiwer p-karakter het met slegs 1% s-karakter. Die een vry elektronpaar van elke swaelatoom is sferies om die kern versprei in die 3s-orbitaal, terwyl die oorblywende elektronpaar op die 90° -as voorkom as 3p- π - elektrone.

Die optimum dihedriese hoek behoort volgens teoretiese berekeninge 105° te wees in bogenoemde geval, maar die waarde wat eksperimenteel bepaal is, is 90° . Dit is toe te skryf aan 'n coulombiese afstoting tussen die ongedeelde p-elektrone op aangrensende swaelatome. Pauling het bv. die dihedriese hoeke vir ringe van 6, 8, 10 en 12 swaelatome bereken en gevind dat dit respektiewelik 69° , 103° , 119° en 129° is. Die S_8 -ring is die mees stabiele omdat dit die enigste is wat 'n dihedriese hoek in die optimum gebied van 90 - 110° het.

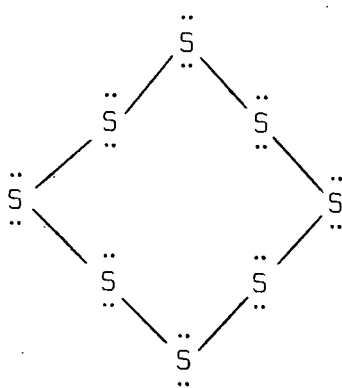
(ii) Die bindingshoeke van divalente swael kan net so goed toegeskryf word aan die vorming van sp^3 -hibriedbindings^{1,51}; in hierdie geval is die grootte van die bindingshoeke naby dié van die tetrahedriese hoek van 109° .

(iii) Dit is ook moontlik dat die oorvleueling van die 3p- π -elektronpaar van die een swaelatoom met 'n 3d-orbitaal van die ander kan lei tot die vorming van 'n swak pd- π -binding²⁰⁷, wat die konfigurasie stabiliseer met 'n dihedriese hoek van 90° .

Al drie die moontlikhede wat hierbo genoem is, is teoreties afgelei. In teenstelling hiermee het Schmidt³⁰⁴ onlangs die probleem op 'n verfrissende wyse aangepak deurdat hy probeer het om die karakter van die disulfiedbinding te bepaal met behulp van gegewens wat eksperimenteel verkry

is. Die feit dat suurstof in slegs twee verbindings met homself (osoon en O_2) bindings vorm waar dit twee ongepaarde elektrone besit, terwyl swael ongeveer 10^6 sulke tipes verbindings vorm, is deur Schmidt toegeskryf aan die verskille in die grondtoestande van hul elektrone. Suurstof kan net bindings vorm met behulp van p-orbitale of sp-hibriede, terwyl die swaelatoom ook nog vyf vry d-orbitale beskikbaar het. Swael kan dus die oktetreël oorskry en heelwat gevalle hiervan is dan ook bekend, bv. SF_6 .

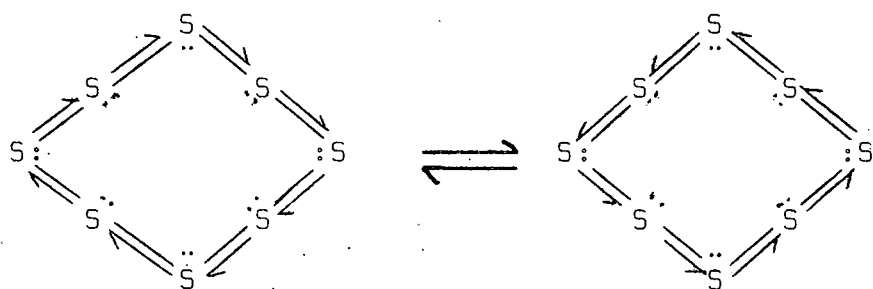
Alhoewel die meeste chemici die siening van Pauling (suiwer σ -bindings tussen p-elektrone) aanvaar, het Schmidt gevind dat baie eksperimentele bevindings nie hierdeur verklaar kan word nie en dat die resultate baie beter inpas by 'n struktuur waar die swael van sy d-orbitale gebruik maak vir binding. Volgens die klassieke teorie moet die S_8 -ring sestien vry elektronpare besit, en aangesien dit dus 'n Lewis-basis is, moet dit as volg daar uitsien:



Die reaksies van nukleofiele reagense met hierdie ring toon dat die swaelatome egter in werklikheid elektrofiel is. Dit beteken dat die swaelatome so 'n sterk neiging het om hul orbitale uit te brei, dat hulle in meervoudige bindings kan oorgaan, wat die gebruik van d-orbitale impliseer. 'n Wisselwerking van nie-bindende p-elektrone met vry d-orbitale kan op twee maniere verklaar word: óf deur hibridisering óf deur ontkoppeling van die gepaarde elektrone in die grondtoestand.

Uit die eksperimentele gegewens blyk dit dus dat die vry elektronpare in die S_8 -ring ook betrokke is by die vorming van die disulfiedbinding deur middel van uitbreiding na die d-orbitale. Schmidt³⁰⁴ het dan ook beweer dat die π -elektrone nie meer direk lokaliseerbaar is nie, dat elke

swaelatoom 'n 10-elektron orbitaal besit, en dat die swaelring as volg daar uitsien:



Volgens Pryor²⁸³ is daar nog nie genoeg inligting beskikbaar om te kan verduidelik watter orbitale by die bindings van swael betrokke is nie; dit geld veral vir die d-orbitale. Verder het Kimball¹⁹³ gewys dat bindingshoeke by 110° verklaar word deur bindings met 25% s-karakter, 0-75% d-karakter en die res as p-karakter.

E. Rotasie om die S-S-binding

Daar is 'n beperking op die rotasie om die S-S-binding. Die grootte van die energieheuwel is in 'n hele aantal gevalle bereken uit termodinamiese en spektroskopiese data. By dimetieldisulfied³²¹ is dit 9.5 Kkal/mol, by diëtioldisulfied³²² 13.2 Kkal/mol en by S_2Cl_2 14.2 Kkal/mol¹⁶⁰.

Hierdie beperking op die rotasie om die disulfiedbinding is waarskynlik toe te skryf aan die neiging van die ongedeelde 3p-elektrone op die twee swaelatome om te oorvleuel²⁷². Hierdie oorvleueling van 3p- π -elektrone lei tot 'n coulombiese afstoting tussen die elektronpare wat 'n maksimum waarde het by 0° en 180° en 'n minimum bereik by 'n dihedriese hoek van 90° . Hierteenoor het Bergson^{25,26} beweer dat die disulfiedbinding pd - π -binding karakter moet besit om die beperking op die rotasie te kan verklaar.

As die beperking op die rotasie om die disulfiedbinding inderdaad in die orde van 10-20 Kkal/mol is, sal die teenwoordigheid van disulfiedgroepe in proteïene belangrike steriese invloede uitoefen. In 'n proteïen kan daar dus disulfiedbindings bestaan met verskillende grade van wringspanning om die disulfiedbinding. Nie alleen sal dit distorsies in ander dele van die molekule veroorsaak nie, maar die moontlikheid bestaan ook dat die disulfiedbindings self verskillende reaktiwiteite kan besit.

III. DIE STERKTE VAN DIE DISULFIEDBINDING

A. h Korrelasie tussen die swael-swael-bindingsafstand en die aktiveringsenergie nodig om die binding te breek:

Een van die belangrikste aannames wat by die studie van reaksiesnelhede gemaak word, is dat daar 'n geaktiveerde kompleks as intermediêre stap in die reaksie gevorm word. Die reagerende stowwe, wat genoegsame energie bevat, kom baie naby aan mekaar en dan vind 'n herrangskikking van valensbindings en energieë plaas om die geaktiveerde kompleks te vorm, wat vervolgens ontbind om die reaksieprodukte te gee. Die aktiveringsenergie van 'n reaksie word gedefinieer as die ekstra energie wat die reagerende molekules nodig het om die geaktiveerde kompleks te kan vorm.

Die vraag wat nou ontstaan, is of daar enige verband is tussen die lengte van 'n binding en die aktiveringsenergie wat nodig is om hierdie binding te breek. Heelwat outeurs^{114,153;154,156,273} het al op teoretiese gronde beweer dat daar wel 'n verband moet wees. McKelvie²⁴⁵ het bv. beweer dat die verband tussen die bindingsenergie, E_{SS} , en die swael-swael-afstand, r_{SS} , die volgende is:

$$E_{SS} = \frac{513}{r_{SS}^3}$$

Davis en medewerkers^{78,79} het onlangs na 'n reeks eksperimente tot die baie belangrike gevolgtrekking gekom dat daar beslis 'n verband bestaan tussen die aktiveringsenergie, E_a , en die swael-swael-bindingsafstand. Eersgenoemde is 'n omgekeerd eweredige funksie van die bindingsafstand:

$$E_a = \frac{C}{r_{SS}^3}$$

(C is 'n konstante)

Die aktiveringsenergie is bepaal vir die splitsing van die S-S-binding deur sianied- of sulfietione en dit is gevind dat die verband tussen E_a en die swael-swael-bindingsafstand die volgende is:

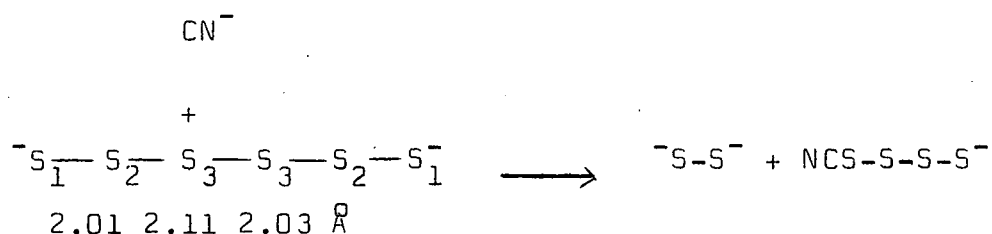
$$\text{Vir CN}^-: E_a = \frac{99}{r_{SS}^3} \text{ Kkal/mol}$$

$$\text{Vir SO}_3^-: E_a = \frac{110}{r_{SS}^3} \text{ Kkal/mol}$$

Uit bogenoemde vergelykings blyk dat die aktiveringsenergie vir die splitsing van die swael-swael-binding direk eweredig is aan die bindingsenergie. Met sianied

is die aktiveringsenergie $E_a = 0.19 E_{SS}$ en met sulfiet is $E_a = 0.21 E_{SS}$. Die aktiveringsenergie verskil dus baie min vir sianied- en sulfietione en is ongeveer een-vyfde van die bindingsenergie.

Verder blyk dit dat die aktiveringsenergie wat nodig is om die disulfiedbinding te splits, afneem met toenemende bindingslengte. Deur dus die lengtes van die swael-swael-bindings in bv. heksasulfied te bepaal, kon Davies⁷⁹ voorspel watter binding eerste deur sianied gebreek sal word.



Die binding tussen swaelatome 2 en 3 is die langste en atoom 3 moet dus aangeval word omdat die afstand tussen die negatiewe ladings van die sianied en sulfied groter is as wanneer atoom 2 aangeval word. Dit is ook eksperimenteel bewys dat hierdie aanname korrek is⁷⁹.

B. h Vergelyking van die sterktes van O-O- en S-S-bindings

Die bindingsdissosiasie-energie, D, word gedefinieer as die energie benodig om h spesifieke binding in h molekule te breek²⁸³ en word gewoonlik bereken uit kinetiese gegewens. Uit die beskikbare data^{72,134,169,234,238,324} blyk dat die binding tussen twee divalente swaelatome sterker is as die binding tussen twee divalente suurstofatome.

	D (S-S) Kkal/mol
CH ₃ -S-S-CH ₃	67 [±] 6
C ₂ H ₅ -S-S-C ₂ H ₅	69 [±] 6
C ₃ H ₇ -S-S-C ₃ H ₇	68 [±] 6
CH ₃ -S-S-C ₂ H ₅	72
H-S-S-H	72
	<u>D (O-O)</u>
C ₂ H ₅ -O-O-C ₂ H ₅	32
H-O-O-H	48

Alhoewel die S-S-binding heelwat sterker is as die O-O-binding, ondergaan dit met nukleofiele reagente baie makliker ioniese splitsing as peroksiede. Die verklaring

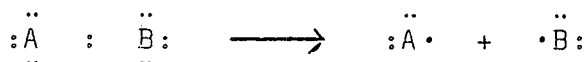
hiervoor is die beskikbaarheid van 3d-orbitale van die swaelatoom, wat in die oorgangstadium gebruik kan word.

Alhoewel $D(S-S)$ taamlik hoog is by disulfiede, is onlangs gevind¹⁸⁸ dat die bindingsdissosiasie-energie in die geval van tetrasulfiede en S_8 heelwat laer is en ongeveer 35 Kkal/molekule bedra. Dit is nie heeltemal duidelik wat hierdie drastiese verskille veroorsaak nie en die skrywers het dit toegeskryf aan 'n resonansie-stabilisasie van die drie-elektronbindingstipe^{146,147}.

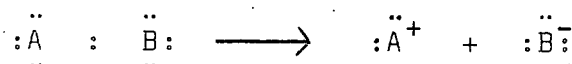
IV. MEGANISMES WAARVOLGENS DIE DISULFIEDBINDING
GESPLITS KAN WORD

Die splitsing van disulfiedbindings behels 'n ontsaglike groot veld waarop organici, fisici en biochemici werk. Hierdie is geen poging om die veld volledig te dek nie en die verskillende tipes splitsingsreaksies sal slegs kortliks bespreek word, terwyl spesiale klem gelê word op die tipe reaksies wat in die eksperimentele werk beskryf word.

Daar bestaan twee meganismes²⁸³ waarvolgens 'n disulfiedbinding gesplits kan word, naamlik homolise en heterolise. 'n Homolitiese splitsing vind plaas wanneer die kovalente binding in 'n molekule A-B so gebreek word dat A en B elk een elektron van die gedeelde paar behou:



Behou een van die fragmente egter albei die gedeelde elektrone, staan die splitsing bekend as heterolise:



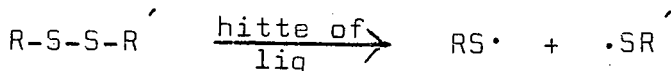
Homolitiese splitsingsreaksies word normaalweg in twee groepe verdeel, naamlik monomolekulêre homolise en bimolekulêre radikaalverplasingsreaksies. Heterolitiese splitsingsreaksies word weer geklassifiseer volgens die tipe reagens wat die splitsing veroorsaak, nl. elektrofiele en nukleofiele heterolises. Nukleofiele substitusie kan volgens 'n S_N1- of S_N2-meganisme plaesvind, terwyl elektrofiele substitusiereaksies volgens 'n S_E1- of S_E2-meganisme verloop.

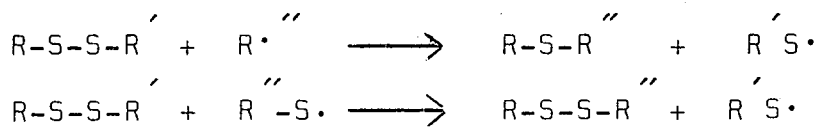
A. Homolitiese splitsing van die disulfiedbinding

Homolitiese splitsingsreaksies staan in die algemeen bekend as vry radikaalreaksies omdat neutrale vry radikale gevorm word.

Daar is twee tipes homolitiese splitsing van die disulfiedbinding bekend:

(1) Monomolekulêre splitsing:



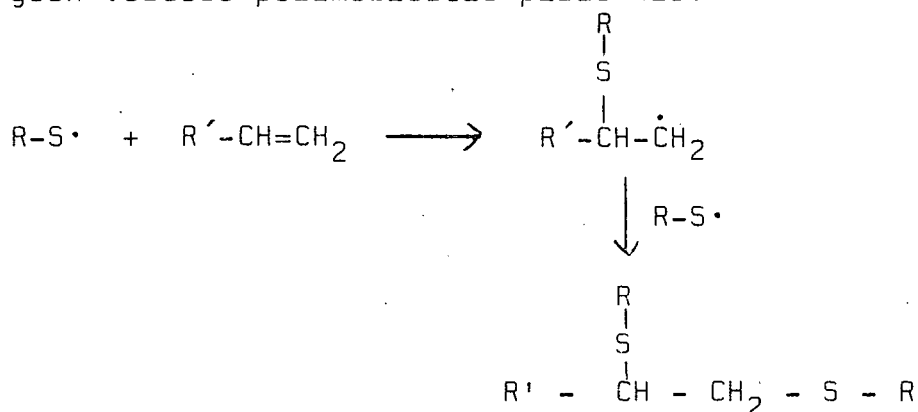
(2) Bimolekulêre radikaalverplasingreaksies:(a) Monomolekulêre splitsing:(i) Termiese homolise:

By 120°C bestaan vloeibare swael uit agtledige ringe met normale viskositeit. Word die temperatuur verhoog tot 159°C, is daar 'n skerp toename in viskositeit (tienduisendvoudig)^{9,300}, omdat S₈-ringe by hierdie temperatuur termiese homolise ondergaan en diradikale gevorm word wat dan weer ander S₈-ringe aanval in 'n kettingreaksie om polimere te gee. Die teenwoordigheid van vry tiëelradikale is aangetoon met elektronparamagnetiese resonansstudies¹⁴³. Die viskositeit neem geleidelik verder toe tot by 187°C, waarna dit vinnig val tot normaal; volgens Gee¹⁴⁵ is hierdie afname in viskositeit te wyte aan splitsing van die polimeerkettings.

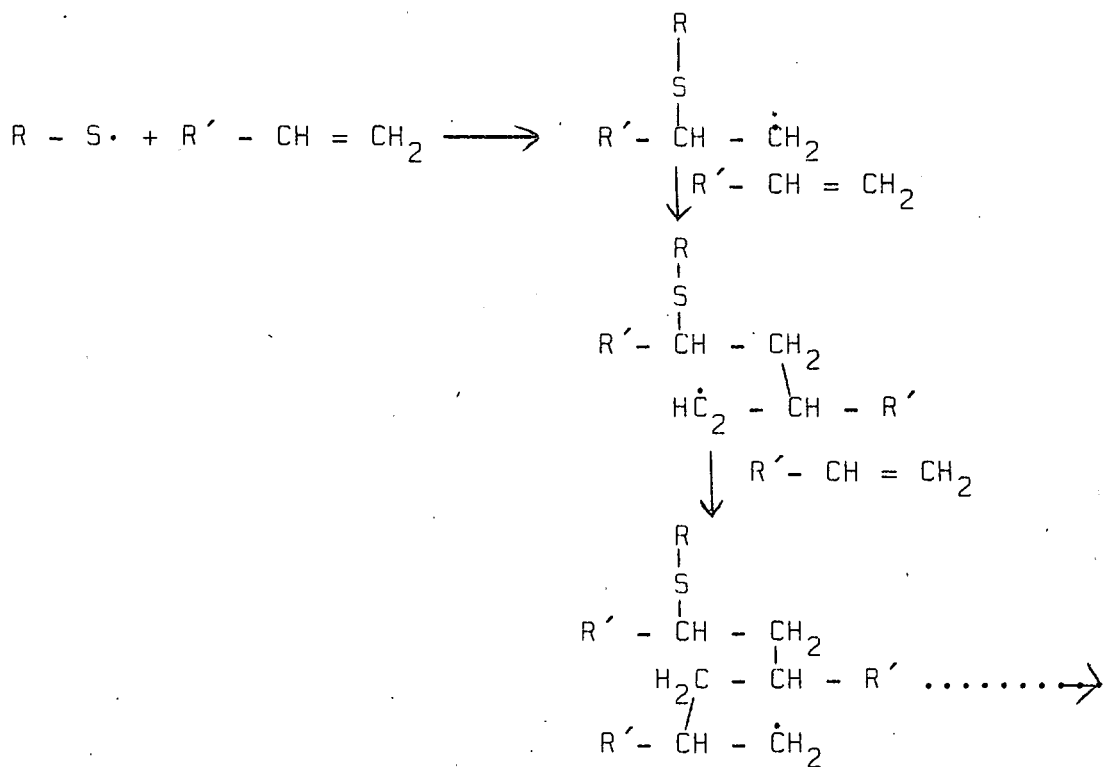
Oorspronklik is vermoed dat alle disulfiede termiese homolise ondergaan omdat baie van hulle omkeerbaar gekleur word by 100-150°C. Hierdie reaksie is verkeerdelik toegeskryf aan die vorming van vry radikale^{198,317,325}, want later is bewys dat omkeerbare kleuring en homolise saam kan plaasvind sonder om noodwendig enige verband met mekaar te hê^{77,222}. Daar bestaan egter heelwat bewyse dat sommige disulfiede wel termiese homolise by 100-150°C ondergaan. Verskeie onsimmetriese diariëldisulfiede dissosieer homolities in kokende dioksaan om simmetriese disulfiede te gee²¹⁸. Tiolnaftoëldisulfied³⁹ en bensotiasoëldisulfied⁷⁷ dissosieer ook bokant 100°C om vry radikale te gee. Verder het Schönberg³¹⁶ die dehidrerende werking van disulfiede toegeskryf aan tiëelradikale wat by hoë temperature gevorm word.

Die feit dat disulfiede die polimerisasie van monomere by hoë temperature in die donker kan inisieer, is 'n beslissende bewys vir die dissosiasie van die disulfiedbinding na tiëelradikale. Wanneer 'n disulfied nie polimerisasie van 'n sekere monomeer kan veroorsaak nie, is dit nie altyd 'n bewys dat geen vry radikale gevorm is nie, want dieselfde disulfied kan die polimerisasie van 'n ander monomeer inisieer^{191,267}. Kern¹⁸⁹ het aangetoon

dat bensotiasoliel-disulfied die polimerisasie van akrilonitriël, metakrilonitriël en metielakrilaat in die donker by 95°C inisieer, maar nie dié van stireen en vinielasetaat nie. Die feit dat disulfiede die polimerisasie van metiel-metakrilaat inisieer, maar nie dié van vinielasetaat of stireen nie, word verklaar deurdat die polistiriël- en polivinielasetaatradikale vinniger met die disulfied-inisiator reageer as wat hulle met hul eie monomere polimeriseer²⁸³. Gevolglik word die iniisiator vernietig en vind geen verdere polimerisasie plaas nie:



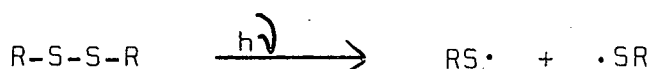
Hierteenoor-reageer die polimetiëlmetakriëlradikaal baie stadig met die disulfiedinisiator (2×10^4 maal stadiger as die radikaal van polivinielasetaat) en polimeriseer dit selfs in die teenwoordigheid van die iniisiator:



Bykans alle disulfiede kan polimerisasiereaksies inisieer en selfs onsimmetriese disulfiede, soos metiel-etieldisulfied, veroorsaak polimerisasie van akrilonitriël³⁰ in die donker by 150°C.

(ii) Fotolitiese dissosiasie:

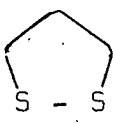

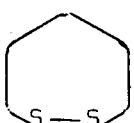
Homolise van die disulfiedbinding kan ook deur lig veroorsaak word:



Die teoretiese grondslag vir hierdie reaksie is lankal gelê. Reeds in 1817 het Grotthuss 'n waarneming gemaak wat gelei het tot die Eerste Wet van die Fotochemie, nl. dat slegs lig wat geabsorbeer word, 'n reaksie in 'n molekule kan veroorsaak²³⁹. Deur die absorpsiespektra van disulfiede te ondersoek, kan vasgestel word watter golflengte lig deur die disulfiedbinding geabsorbeer word. Uit die beskikbare data blyk dit dat alifatiese, aromatiese en sikliese disulfiede almal ultravioletlig absorbeer.

By alifatiese disulfiede toon die ultravioletabsorpsiespektrum 'n breë skouer by 250 m μ . Dit gaan gepaard met 'n intense absorpsie by kort golflengtes. Koch¹⁹⁷ het voorgestel dat die hoë absorpsie by kort golflengtes geassosieer word met polarisasie van die disulfiedbinding en dat homolitiese dissosiasie na vry radikale dus kan plaasvind. Bauer en Carmack¹⁹ het beweer dat die absorpsie by 252 m μ op konjugasie tussen die ongedeelde elektrone van die twee swaelatome dui.

Die ultravioletabsorpsiespektra van verskeie sikliese disulfiede is reeds ondersoek²⁸⁵. By vyf-, ses- en seweledige sikliese disulfiede is gevind dat die absorpsiemaksimum na langer golflengtes verskuif, hoe kleiner die ring word. Hierdie verskuiwing is toegeskryf aan 'n toenemende spanning in die kleiner ringe.

<u>Disulfied</u>		<u>Absorpsiemaksimum</u>
1,2- ditiolaan		330 m μ
1,2- ditiaan		290 m μ
1,2- ditipaan		260 m μ

Leandri en Tundo²¹⁹ het beweer dat die band by 240 m μ by aromatiese disulfiede dui op konjugasie tussen die swael en die ring, die band by 270 m μ veroorsaak word deur die bensenoidchromofoor en die skouer by 300-320 m μ ontstaan as gevolg van die aktivering van die elektrone van die disulfied.

Die bindingsdissosiasie-energie van 'n disulfiedbinding is ± 70 Kkal/mol en indien daar dus meer energie as 70 Kkal/mol beskikbaar is, kan die disulfiedbinding homolise ondergaan. Die energie van lig neem as volg toe²³⁹ met 'n afname in golflengte:

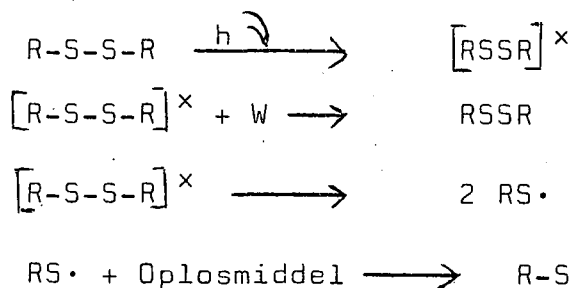
<u>Golflengte (μ)</u>	<u>Energie (Kkal/mol kwantum)</u>
400	71
313	91
285	100
254	112
200	142

Dit blyk dus dat ultravioletlig genoeg energie besit om fotolitiese dissosiasie van die disulfiedbinding te kan veroorsaak. Bestraling van dialkiel-^{120,122,253,287,366}, diariel-^{237,290,291} en onsimmetriese disulfiede^{30,218} met ultravioletlig veroorsaak dan ook homolise van die disulfiedbinding en tiëlradikale word gevorm.

Dieselfde reaksie vind plaas by hoër sulfiede, soos trisulfiede²⁵³, en ook by sikliese sulfiede, bv. die S_8 -ring¹⁰⁶, lipoënsuur³⁷⁹ en 1,2-ditiolaan¹⁶. Die fotolitiese dissosiasie van sommige aromatiese disulfiede verloop so maklik dat hulle gebruik word as aanvangskatalisatore by radikaalreaksies²⁹¹. Die disulfiede word gewoonlik met polichromatiese ultravioletlig bestraal, maar selfs wanneer monochromatiese lig met dieselfde golflengte as λ_{maks} van die disulfied gebruik word, word tiëlradikale gevorm. So 'n geval word gevind wanneer 1,2-ditiaan ($\lambda_{\text{maks}} = 286 \mu$) met monochromatiese lig van golflengte 286 μ bestraal word³³⁰.

Die teenwoordigheid van tiëlradikale is in bestraalde disulfiede aangetoon met elektronparamagnetiese resonans (E.P.R.)-ondersoeke^{34,121,209} en met polimerisasiereaksies. Die meeste disulfiede inisieer bv. die polimerisasie van vinielasetaat by fotolise^{116,189,191}. Verder gee disulfiede wat in vakuum in die vaste toestand bestraal is, stabiele E.P.R.-seine. Dieselfde karakteristieke sein is verkry vanaf verskillende tipes disulfiede soos sistien^{157,209}, sistamien¹⁶⁴, glutatioondisulfied¹⁶⁴, 1,2-ditiaan³³⁰, $CF_3-S-S-CF_3$ ⁴⁰, ens. en dit is bewys dat hierdie sein afkomstig is van die tiëlradikaal (R-S·). Proteïene wat disulfied-groepe bevat, bv. ribonuklease, pepsien en tripsien, gee na bestraling ook hierdie sein³²⁶⁻³²⁸. Die tiëlradikale wat vanaf die bestraalde disulfiede gevorm word, stabiliseer gewoonlik in lug deur die vorming van tiole²³⁷.

Lyons²³⁷ het die kwantumopbrengste van verskeie aromatiese disulfiede bepaal en gevind dat dit 0.046 is. Volgens hom word die kwantumopbrengs nie beïnvloed deur die oplosmiddel en die disulfied se geaardheid en konsentrasie nie. Hy het voorgestel dat die fotolise as volg verloop:



waar $[\text{RSSR}]^x$ 'n foto-geaktiveerde molekule is en W 'n inerte liggaam of wand.

In teenstelling met die bevindings van Lyons, gee verskeie sikliese disulfiede³⁷⁹ waaronder lipoïensuur, kwantumopbrengste van ongeveer 1.0. Hierdie hoë waardes is na bewering te wyte aan spanning in die ringstrukture^{25,130}.

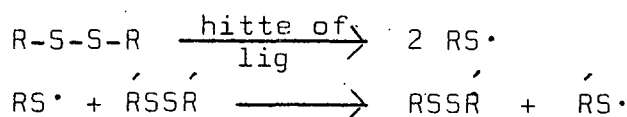
(b) Bimolekulêre radikaalverplasingreaksies op disulfiedbindings:

By S_H2 -reaksies* val vry radikale die disulfiedbinding aan deur 'n tiëlradikaal te verplaas:



In die reaksie van triëtielfosfiet met disulfiede word 'n tiëlradikaal verplaas deur 'n koolstofradikaal wat afkomstig is van die ontbinding van die triëtielfosfiet³⁶⁸. Verskeie ander radikale, soos trifenielmetiel³¹⁸ en koolwaterstofradikale²⁷⁶, val disulfiede op 'n soortgelyke wyse aan.

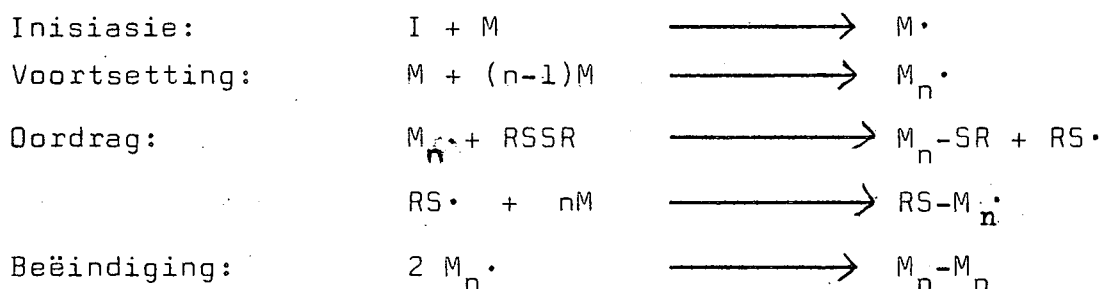
Tiëlradikale val self ook die disulfiedbinding aan en by mengsels van disulfiede vind vinnige uitruiling onder fotolitiese of termiese kondisies plaas met die vorming van onsimmetriese disulfiede^{29,70,292}:



Onsimmetriese disulfiede ontbind op 'n soortgelyke wyse gedurende bestraling om die ooreenkomstige simmetriese disulfiede te vorm⁹¹.

* homolitiese substitusie-reaksies, na analogie van S_N2 -reaksies¹⁰⁰.

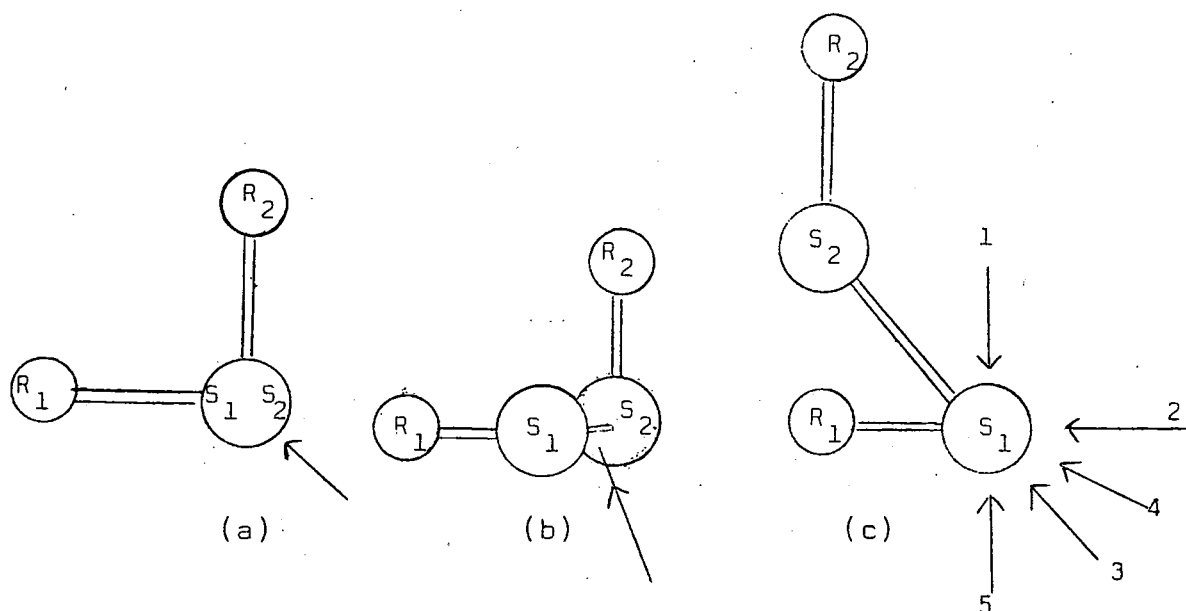
Die meeste inligting oor S_H2 -reaksies is verkry vanaf die reaksies van disulfiede as kettingoordragreagense by polimerisasie²⁸³. 'n Kettingoordragreagens reageer met 'n groeiende polimeerradikaal om een molekule af te sluit en 'n ander te begin. Na bewering verplaas die groeiende polimeerradikaal 'n tielradikaal uit die disulfied en is die reaksiemeganisme by kettingoordrag²⁸³ die volgende:



Bogenoemde meganisme is bevestig deur die bevindings van Tobolsky³⁵⁹ en Pierson²⁷⁶.

Die data wat verkry is vanaf die kettingoordrag by disulfiede, is gebruik om steriese invloede by S_H2 -reaksies te ondersoek²⁸². Dit is gevind dat hoe groter die groep R is, hoe laer word die snelheid van aanval op die disulfiedgroep in R-S-S-R. So bv. is die reaksie ses-en-sestig keer stadiger met R = t-butiël- as waar R = metiel-. Dit is egter baie minder as by ioniese S_N2 -reaksies op disulfiede, waar die ooreenstemmende faktor van vertraging, 10^6 is.

Dit is nog nie bekend vanuit watter rigting die radikaal die disulfiedgroep aanval nie. Daar bestaan verskeie moontlikhede; die radikaal kan die disulfiedbinding of die swaelatome aanval.



Aanval op die disulfiedbinding wat plaasvind uit die rigtings (a) en (b) is vry van enige steriese verhinderings, selfs waar $R = t$ -butiel. Val die radikaal h swaeltotom aan en nie die disulfiedbinding nie, is daar vyf moontlike rigtings vir aanval (figuur (c)):

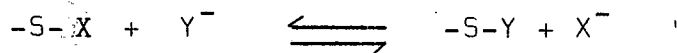
- (1) Afwaartse aanval op die S-atoom.
- (2) Aanval van die agterkant van die R-S-binding.
- (3) Aanval van die agterkant van die S-S-binding.
- (4) Aanval uit h rigting tussen rigtings (2) en (3).
- (5) Opwaartse aanval op die S-atoom.

Volgens Bergson²⁶ vind aanval uit rigting (3) plaas. Dit is die Walden-inversierigting waar die drie atome betrokke by die breking en vorming van die binding in h reguit lyn lê. Die steriese verhinderings by aanval neem as volg toe by die verskillende rigtings: $2 < 5 \sim 3 < 1$. Daar is nog nie genoeg inligting beskikbaar om vas te stel uit watter rigting die aanval plaasvind nie, en dit is selfs moontlik dat h groot persentasie van die aanval op die waterstofatome van die koolstofatome kan plaasvind²⁸³.

B. Nukleofiele splitsing van die disulfiedbinding

(a) Meganisme:

Die aanval van nukleofiele reagent op disulfiede behels h uitgestrekte veld wat in h chaotiese toestand was totdat Olav Foss op dié gebied begin werk het. Deur h reeks briljante studies^{123,125} het hy bewys dat die aanval van enige nukleofiele reagent op h disulfied slegs h spesiale geval van die volgende algemene reaksie is:



Bogenoemde is h tweede orde-verplasingsreaksie^{17,57,108,270} en dus van die tipe S_N2 .

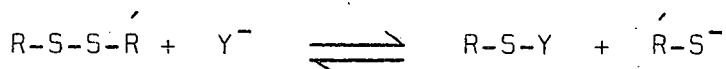
Wanneer h nukleofiele reagent Y^- h disulfied aanval, is daar twee faktore wat bepaal of h merkaptiedgroep verplaas sal word of nie, nl. die relatiewe affiniteite van X en Y vir swaël, en stereochemiese invloede.

(b) Die relatiewe tiofiliteite van nukleofiele reagente:

h Disulfied kan as h sulfenielmerkaptied beskou word:



h Reagens Y^- sal h merkaptiedgroep ($R-S^-$) uit die disulfied verplaas indien Y^- h groter affiniteit vir $R-S^+$ toon as wat $R-S^-$ daarvoor het:



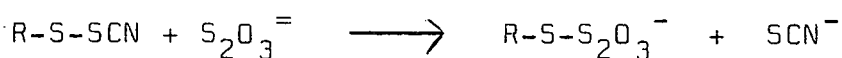
Indien daar geen verplasing plaasvind nie, beteken dit dat die merkaptiedanioon ($R-S^-$) h groter affiniteit vir $R-S^+$ het as Y^- (mits daar geen stereochemiese invloede is nie.) Hierdie affiniteit word S-nukleofiliteit of tiofiliteit genoem²⁶⁹.

Foss¹²⁵ was in staat om h aantal anione te rangskik volgens hul tiofiliteite deur gebruik te maak van hul oksidasiepotensiale. Hoe laer die oksidasiepotensiaal van die sisteem $2XS^-/XSSX$, hoe groter is die basiese sterkte van XS^- .

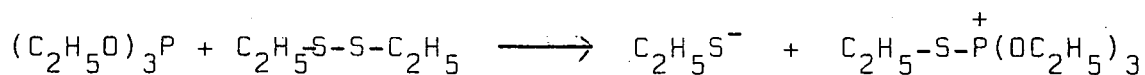
Elektrodepotensiaal E'_o (volt, vs. N.W.E.) vir sisteme $2 XS^- \rightleftharpoons XS-SX + 2e$	
XS^-	E'_o
SCN^-	+ 0.77
$S_2O_3^{=}$	+ 0.20
RS^-	ca.0

E'_o is die potensiaal met die tekenkonvensie (teenoorgesteld aan E^o , sien Latimer²¹³) soos gebruik deur Anderson en Plaut² en wat meer algemeen deur biochemici gebruik word.

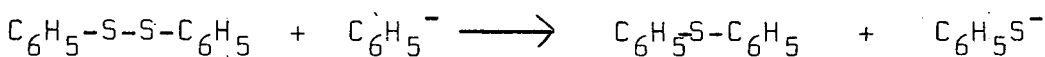
Uit bogenoemde data kon Foss voorspel dat die volgende reaksie heeltemal na regs behoort te verloop:



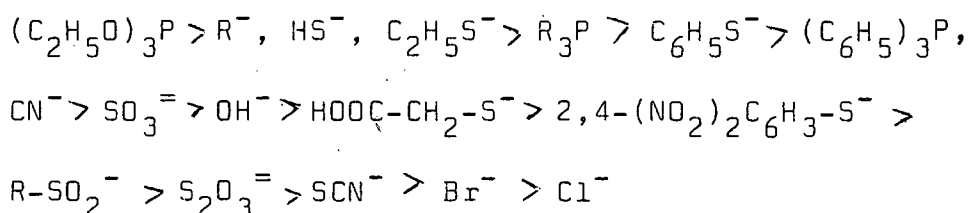
Dit is dan ook eksperimenteel bewys dat dit wel die geval is, en gevolglik is $S_2O_3^{=}$ meer tiofiel as SCN^- . Fosforbevattende verbindings is ook sterk tiofiel reagentse. Triëtiel-fosfiet¹⁸ verplaas bv. die etielmerkaptiedioon:



Karboniumione is ook besonder tiofiel, want feniëldisulfied, wat normaalweg baie stabiel is, word deur feniellitium gesplits³¹⁸:



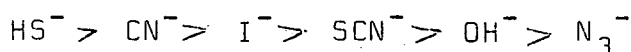
Uit redokspotensiale en ewewigstudies is die volgende lys^{125,269,283} van relatiewe tiofiliteite van nukleofiele reagense opgestel:



In die verbinding $-S-X$ sal X deur enige anioon Y^- verplaas word indien Y^- hoër as X op bogenoemde tabel voorkom, d.w.s. indien Y meer tiofiel is as X .

Uit die tabel hierbo blyk dit dat CN^- meer tiofiel is as SCN^- , terwyl $SO_3^{=}$ meer tiofiel is as $S_2O_3^{=}$. Foss¹²⁵ het die volgende reël hieruit afgelei, nl. dat 'n antio-anioon* die ooreenstemmende tio-anioon kan verplaas.

Dit is nog nie bekend watter faktore die tiofiliteit of S-nukleofiliteit van 'n reagens bepaal nie en daar bestaan selfs heelwat onduidelikheid oor nukleofiliteit in die algemeen. Tiofiliteit en nukleofiliteit teenoor bv. koolstofatome stem ook nie ooreen nie. So is die orde van nukleofiliteit van reagense teenoor die koolstof van CH_3Br die volgende:



Volgens Edwards⁹³ word die nukleofiliteit van 'n reagens bepaal deur: basisiteit, polarisasie en die α -effek, d.i. die teenwoordigheid van ongedeelde elektronpare op die atoom net langs die nukleofiele atoom. Hierdie drie faktore is essensieel onafhanklik van mekaar¹⁷⁷. Die α -effek speel by alle substrate in 'n mindere of meerdere mate 'n rol. Substrate wat met die proton ooreenstem deurdat dit 'n hoë positiewe lading en 'n lae aantal elektrone in die buite-orbitale besit, se reaktiwiteit berus op basisiteit, terwyl die reaktiwiteit van substrate met 'n lae positiewe lading en baie elektrone in die buite-orbitale weer bepaal word deur polarisasie.

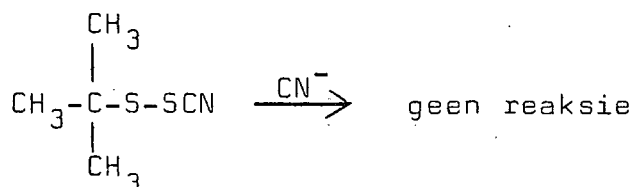
* 'n Antio-anioon is volgens definisie 'n anioon wat so 'n affiniteit vir swaël het dat dit 'n stabiel tio-anioon vorm as dit met vry swaël reageer. Ander bekende antio-anioon/tio-anioon pare is:

fosfien-fosfiensulfied, sulfinaat-tiosulfinaat, sulfied-polisulfied²⁶⁹.

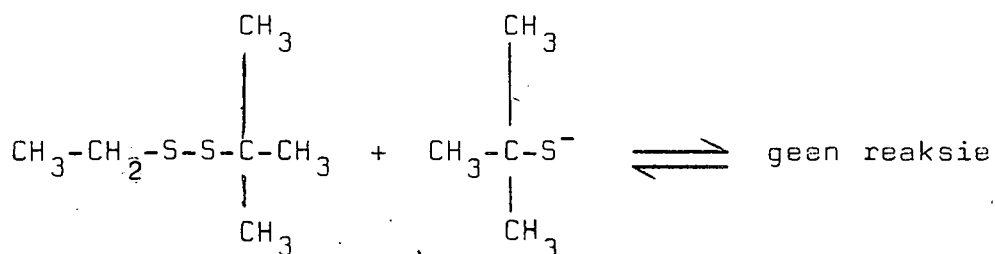
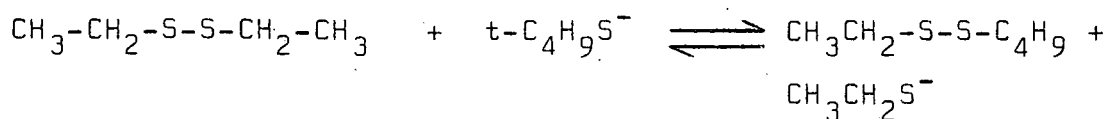
Elemente van die derde en vierde periodes van die Periodieke Tabel, bv. fosfor en swael, wat maklik polariseerbare elektrone bevat, vorm makliker bindings met swael as bv. elemente van die tweede periode, soos stikstof en suurstof²⁶⁹. Wanneer die lys van relatiewe tiofiliteite bestudeer word, blyk dit dat 'n nukleofiele aanval op swael nie net van polarisasie afhang nie, maar dat basisiteit ook 'n rol speel. Dit is nie bekend wat die relatiewe bydraes van hierdie twee faktore is nie; dit mag verskil in verskillende gevalle. Dit is wel bekend dat polarisasie 'n groter rol as basisiteit speel by die splitsing van S_8 -ringe. By die nukleofiele splitsing van 'n aantal onsimmetriese disulfiede speel basisiteit egter weer 'n groter rol²⁷⁰.

(c) Stereochemiese invloede:

In al die gevalle waar kinetiese data bekend is, is die verplasing van divalente swael 'n bimolekulêre reaksie¹²⁹ van die tipe S_N2 . By koolstof word hierdie tipe reaksie beïnvloed deur steriese faktore en dieselfde effek word ook by swaelverbindings gevind. Alhoewel CN^- meer tiofiel is as SCN^- , kan dit nogtans nie tiosianaat uit t-butielsulfeniel-tiosianaat verplaas nie¹⁶⁶:



t-Butielmerkaptied verplaas etielmerkaptied uit diëtiel-disulfied, maar is nie in staat om etielmerkaptied uit etiel-t-butiel-disulfied te verplaas nie²⁴⁴:



Verder is dit ook bekend dat disulfiedbindings wat direk aan tersiêre koolstofatome gebind is, nie deur CN^- of SO_3^- gesplits word nie³⁰⁹.

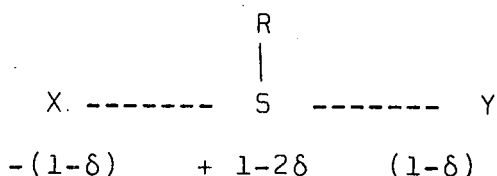
Pryor²⁸³ gee die volgende tabel aan vir die vergelyking van die relatiewe snelhede van S_N2 -reaksies op swael en koolstof vir die reaksies:



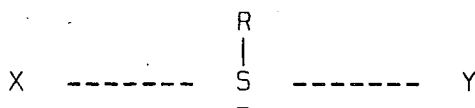
R	Relatiewe reaksiesnelheidskonstantes	
	R-CH ₂ -X	R-S-SO ₃ ⁻
CH ₃	100	100
C ₂ H ₅	40	50
i-C ₃ H ₇	3.0	0.7
t-C ₄ H ₉	10 × 10 ⁻⁴	6 × 10 ⁻⁴

Uit bogenoemde tabel blyk dat dieselfde stereochemiese invloede (van die neopentieltype) wat by koolstof gevind word, ook by nukleofiele substitusie op swael 'n rol speel.

Fava en medewerkers¹⁰⁸⁻¹¹⁰ het die struktuur en ladingverspreiding in die oorgangstoestand by verplasingsreaksies van divalente swael ondersoek in 'n poging om vas te stel vanuit watter rigting nukleofiele aanval op die disulfiedbinding plaasvind. Hulle het tot die gevolgtrekking gekom dat verplasings vanaf swael deur 'n rugkantaanval plaasvind, sodat die intredende en uittredende groepe in 'n reguit lyn lê, net soos in die geval van koolstof⁸¹. In die oorgangstadium¹⁰⁹ kan die ladings op twee maniere versprei wees. Die sentrale swaelatoom kan minder negatief wees as in die beginstadium (dit behels die gebruik van slegs die s- en p-orbitale van die swael):



Die swaelatoom kan ook meer negatief wees as in die beginstadium. Hier word gebruik gemaak van die leë d-orbitale van die swaelatoom wat dan tien valenselektrone het met een paar in 'n 3d-orbitaal:



Omdat swaelbevattende verbindings makliker nukleofiele splitsing ondergaan as verbindings wat suurstof bevat en geen vry d-orbitale besit nie, is laasgenoemde teorie waarskynlik korrek.

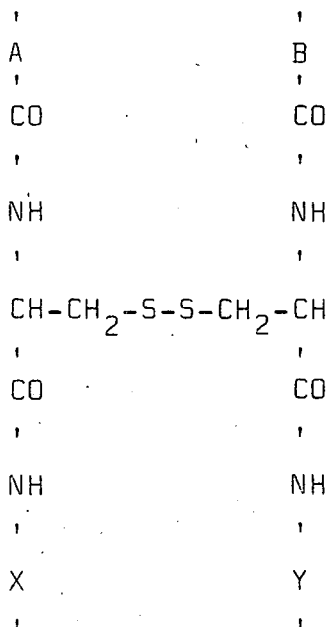
Soos reeds vermeld, verloop die splitsing van 'n disulfiedbinding deur 'n nukleofiele reagens Y^- volgens 'n S_N2 -meganisme. In baie gevalle lê die ewewig ver na links omdat RS^- meer tiofiel is as Y^- , of omdat steriese faktore die aanval van Y^- verhinder. In sulke gevalle kan splitsing van die disulfied langs ander weë plaasvind. Afhangende van die tipe disulfied en van Y^- word 'n groot verskeidenheid produkte gevorm. Vry swael^{141,163}, H_2S ^{306,310}, sulfiensure³⁰³, monosulfiede³⁴⁶, ens., is al geïdentifiseer en daar bestaan verskeie splitsingsreaksies waardeur die vorming van hierdie produkte verklaar word. Hierdie meganismes word in hoofstuk VIII bespreek.

V. DIE REAKTIWITEIT VAN DIE DISULFIEDBINDINGS IN
PROTEÏENE

Dit is al lank bekend dat daar groot verskille bestaan in die reaktiwiteite van disulfiedbindings in proteïene. Hierdie onderwerp is dikwels bestudeer en alhoewel 'n groot aantal publikasies al hieroor verskyn het, is daar nog geen eenvoudige en bevredigende verklaring vir die verskille in reaktiwiteit aangebied nie^{38,54,58}. 'n Studie van die literatuur toon dat die verskille in reaktiwiteit nie net beperk is tot 'n paar geïsoleerde gevalle nie, maar inderdaad 'n eienskap is van elke disulfied-bevattende proteïen, waaronder insulien, albumien, ribonuklease en keratien die bekendste is. Verder is dit ook veelseggend dat hierdie verskille in reaktiwiteit nie net beperk is tot 'n spesifieke reagens nie, maar geld vir enige reagens wat die disulfiedbinding aanval⁵⁴. Dit impliseer dat die reaktiwiteit nie 'n funksie van die reagens is nie, maar eerder beheer word deur faktore wat in die struktuur van die proteïen opgesluit lê.

Danksy die ontwikkeling van doeltreffende chromatografiese skeidingsmetodes en partiële hidrolisettegnieke (ensimaties sowel as nie-ensimaties) is die primêre struktuur* van 'n hele aantal proteïene, insluitende insulien^{294,296,297}, lisosiem¹⁷⁶ en ribonuklease³³⁴, reeds bekend. 'n Onderzoek van die disulfiedbindings van hierdie proteïene toon dat almal in werklikheid onsimmetries is, m.a.v. A, B, X en Y (in onderstaande figuur) is nie identiese aminosuurreste nie, maar kan enige van die gewone aminosure, bv. tirosien, aspartiensuur of lisien, wees.

* Proteïene bestaan uit polipeptiedkettings wat opgebou is uit α -aminosure: die aminosuuropeenvolging in die polipeptiedketting word beskou as die primêre struktuur; die helikse wat ontstaan wanneer die polipeptiedkettings in spirale vou, word die sekondêre struktuur genoem; en die wisselwerkinge wat die verskillende helikse aanmekaar skakel, die tersiêre struktuur. Die aantrekkingskragte tussen die polipeptiedkettings van proteïene kan van uiteenlopende aard wees, soos waterstof-, hidrofobiese of kovalente bindings soos bv. disulfiedbrûe.



Afgesien van die feit dat die swaelatome van die disulfiede dus verskillend gepolariseer kan wees as gevolg van die elektrómere invloede van naburige groepe, bestaan daar ook die moontlikheid dat die swaelatome in verskillende mate steries beskerm kan word deur hierdie groepe. Verder is dit ook moontlik dat groepe in die nabyheid van die disulfiedbinding die reaktiwiteit kan beïnvloed deurdat gelaaide groepe mekaar aantrek of afstoot as gevolg van die invloed van coulombiese kragte.

Dit is bekend dat die reaktiwiteit van disulfiedbindings in proteïene aansienlik verander word deur denaturering van die natuurlike proteïene. Aangesien denaturering die sekondêre en tersiêre struktuur van proteïene verander, moet die reaktiwiteit van die disulfiedbinding o.a. hierdeur beheer word. Teenswoordig word aanvaar dat die proteïenmolekule uit geordende en ongeordende strukture bestaan. Die geordende strukture wat tans die meeste steun geniet^{71,275} is die α -heliks en β -struktuur, terwyl eksperimentele gegewens daarop dui dat die ongeordende struktuur 'n willekeurige kloskonfigurasie inneem³⁰². Dit is bekend dat gewone polimere in oplossing voorkom as ongeordende kettings. Hierteenoor dui die jongste inligting daarop dat proteïenmolekules in oplossing bestaan in 'n vorm wat deels gevou en deels ontvou is²²⁶.

Die volgende tabel, geneem uit die publikasie van Linderström-Lang²²⁶, gee die persentasie van die proteïene reste aan wat in 'n gevoude konfigurasie voorkom, soos bepaal deur verskillende tegnieke:

Proteïen	Deuterium uitruiling	Rotasie dispersie	Termodinamies	Veranderings in optiese rotasie
Insulien	0	48	33	66
Ribonuklease	40	15	35	39
Ovalbumien	-	46	-	79
Beeserum-albumien	-	47	-	56
β -Laktoglobulien	70	-	-	100

Denaturering is een van die mees unieke en terselfdertyd ook karakteristieke eienskappe van proteïene en word gedefinieer^{4,187,284} as 'n fisiese of intramolekulêre herrangskikking, eerder as 'n chemiese verandering van die natuurlike proteïenstruktuur, wat die spesifieke ruimtelike konfigurasie van die proteïen verander tot 'n meer ongeordende struktuur sonder dat hidrolise optree van die primêre kovalente bindings.

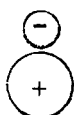
Die hidrodinamiese eienskappe van proteïene word drasties verander deur denaturering. Dit is bekend dat bolvormige proteïene, soos globulien en albumien, 'n groot toename in hul spesifieke viskositeit en wrywingsverhouding toon ná denaturering, en dit word algemeen aanvaar dat dit toe te skryf is aan 'n groter anisometrie wat sy oorsprong het in 'n ontvouing of losdraaiing van die natuurlike polipeptiedkettings^{226,284}. Volgens Kauzmann¹⁸⁷ bestaan 'n gedenatureerde proteïen in ureum in 'n willekeurige kloskonfigurasie.

'n Kenmerk van die denaturering van proteïene is die vrystelling van „verborge" reste in die molekule. Daar is talle voorbeelde bekend waar tiolgroepe of hidrosielgroepe van tirosien nie reageer nie, tensy die proteïen gedenatureer is^{38,58}. Dit beteken dat hierdie sogenaamde „onreaktiewe, trae of verskuilde" groepe in die natuurlike proteïen ontoeganklik is vir reagens as gevolg van die ruimtelike rangskikking van die proteïen.

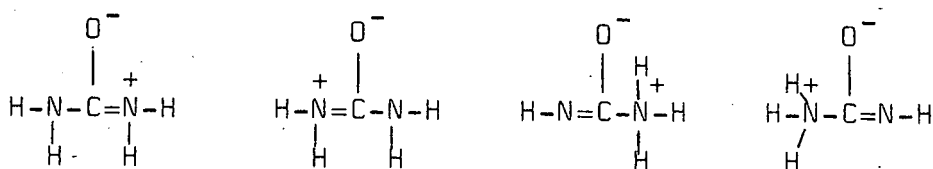
Denaturering word veroorsaak²⁸⁴ deur 'n hele aantal faktore, waarvan warmte, sekere pH-kondisies, meganiese kragte, bestralings (ultraviolet of ioniserend) en sekere tipes molekules (organies sowel as anorganies) die bekendste is. In hierdie ondersoek is ureum gebruik as denatureringsmiddel en dit is dus nodig om die meganisme van proteïendenaturering deur hierdie reagens kortliks te skets. Die

tradisionele verduideliking vir die denaturering deur ureum was dat dit weens sy strukturele ooreenkoms met peptiede in staat is om sterker waterstofbindings met peptiedgroepe as met water te vorm, met die gevolg dat dit interpeptied-waterstofbindings kan breek wat nie deur water geaffekteer word nie. Latere werk^{194,354} het egter om twee redes twyfel hieroor laat ontstaan: dit is bewys dat interpeptied- en ander waterstofbindings relatief onbelangrik is as stabiliserende faktore in die natuurlike proteïenmolekule in water en tweedens is aangetoon dat ureum nie noodwendig sterker waterstofbindings as water vorm nie. So is bv. bewys dat die waterstofbindings tussen water en die peptiedgroep van N-metielasetamied baie sterker is as die interpeptied-bindings tussen die amiedgroepe¹⁹⁵.

Daar bestaan tans twee gedagterigtings oor die denaturerende werking van ureum. Die eerste hipotese is dat ureum in staat is om die hidrofobiese bindings in die molekule te breek deurdat ureum 'n groter affiniteit as water toon vir die nie-polêre aminosuursykettings. Hierdie hipotese is oorspronklik deur Waugh³⁷⁰ voorgestel. Latere eksperimentele bevindings van Bruning⁴² en Nozaki²⁶⁵ is in ooreenstemming met bogenoemde aanname. In teenstelling hiermee het Colacicco⁶⁸ beweer dat bogenoemde hipotese nie al die eksperimentele bevindings verduidelik nie en het hy voorgestel dat ureum as 'n zwitterioon voorkom met 'n positiewe hooflading, vandaar die benaming „ureum-katioon". Die amfipatiese ureummolekule sien as volg daar uit:



en bestaan waarskynlik as een van die volgende strukture:

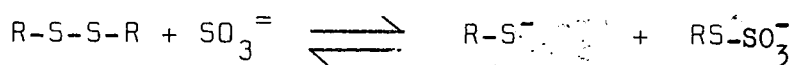


Volgens Colacicco is ureum 'n oppervlak-aktiewe katioon, 'n ioon-uitruiler en baie swak waterstofbindingsreagens en sy denaturerende werking word verklaar deur die ioonbindingskrag van die molekule met proteïene.

VI. DIE REAKSIE VAN SULFIETIONE MET DIE DISULFIEDBINDING

A. Meganisme van die reaksie

Sulfietione splits die disulfiedbinding, en 'n tiol en organiese tiosulfaat (Bunte-sout) word gevorm:



Rosenthal en Oeter²⁸⁹ het aangevoer dat die reaksie van sulfiet op disulfiede deur 'n vry radikaalmeganisme verloop. Die aktiveringsentropieë dui egter op 'n ioniese meganisme.⁵⁸ en verskeie werkers^{18,109,124,126,128} het dan ook bewys dat hierdie reaksie deur middel van 'n heterolitiese splitsing van die disulfiedbinding verloop.

Die splitsing van disulfiedbindings deur sulfietione is 'n nukleofiele verplasingsreaksie^{64,235,269} en is analoog aan die reaksie van $SO_3^{=}$ met karbonielverbindings³⁴⁰. Die reaksie is bimolekulêr en omkeerbaar, en kinetiese data is in baie gevalle beskikbaar^{56,247,342,343}. Die reaksiesnelheid is sterk afhanklik van pH, want by lae pH-waardes vorm die minder tiofiele bisulfietioon HSO_3^- waarvan die reaksiesnelheid weglaatbaar klein is in vergelyking met dié van $SO_3^{=}$.

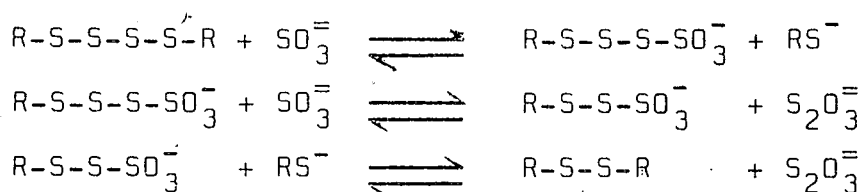
Die reaksiesnelheid neem na bewering⁵⁸ ook sterk af as die netto lading in die omgewing van die disulfiedbinding verander van positief na negatief. Verbindings met 'n positiewe lading reageer vinnig, dié met 'n negatiewe lading stadig en neutrale verbindings met 'n intermediêre snelheid. Totale ladings het ook 'n invloed op die reaksiesnelheid; so reageer 'n ongelaaide sistienderivaat (diasetielsistienester) stadiger as die zwitterioönvorm van sistien⁵⁸.

Die invloed van die ladings op die reaksiesnelhede word geïllustreer deur die resultate van Cecil en McPhee⁵⁸ wat in onderstaande tabel saamgevat is:

Disulfied	Snelheidskonstante met SO_3^- by 25°C (liter mole ⁻¹ min ⁻¹)	Netto lading op molekule
Sistamien	6700 - 8600	+ 2
Diasetielsistienester	265	0
Diformielsistien (geïoniseer)	9	- 2
Sistien	1100	0
	3	- 2
Glutatioondisulfied	160	- 2
	10	- 4
Homosistien	155	0
	2	- 2

Disulfiede met groepe wat ioniseerbaar is bokant pH 5, toon 'n optimum pH vir die skynbare reaksiesnelheidskonstante met sulfietione. Met toenemende pH is daar 'n toename in die reaksiesnelheid as gevolg van 'n verhoging in die konsentrasie van SO_3^- , wat egter teengewerk word deur 'n afname in snelheid as gevolg van 'n toename in die persentasie meer negatief gelaaiete disulfiedmolekules. Die optimum pH hang af van die pK-waardes van die verskillende groepe in die disulfiedmolekule en van die snelheidskonstantes vir reaksies van die verskillende gelaaiete vorms met sulfietione⁵⁸.

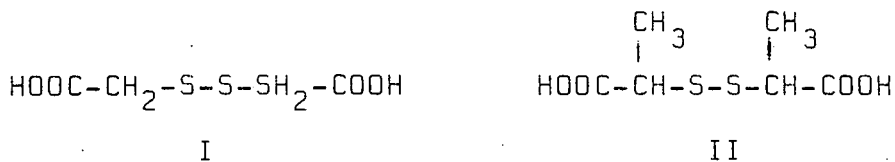
Die basiese sterkte van die swaelatoom van die sulfietioon (SO_3^-) word heelwat verminder deur resonansie met die suurstofatome en gevolglik is dit nie so 'n sterk tiofiele reagens as bv. die sulfiedioon (S^-) nie²⁶⁹. Dit is nogtans 'n antio-anioon, want dit reageer maklik met vry swael om tiosulfaat te vorm¹²⁷. Sulfiet is ook in staat om polisulfiede te ontswael:



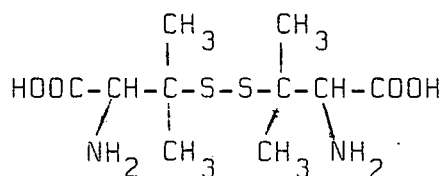
Omdat tiosulfaat die minste tiofiele is van al die ione betrokke in bogenoemde reaksie, lê die ewewig ver na regs en word die tetrasulfied maklik ontswael¹²⁷. Politionate word op 'n analoë wyse deur sulfietione ontswael¹²³.

B. Stereochemiese invloede

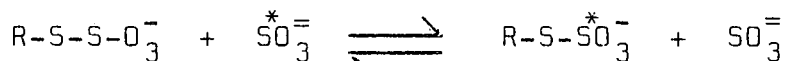
Die reaksie van sulfietione met disulfiede verloop volgens 'n S_N2 -meganisme en steriese verhinderings kan dus in sommige gevalle verwag word. So is bv. gevind dat ditiodiglikolzuur (I) maklik deur sulfiet gesplits word, terwyl ditiodimelksuur (II) nie reageer nie²⁵⁴.



Disulfiede waarvan die swaelatome aan tersiêre koolstofatome gebind is, reageer ook nie met sulfiet nie^{289,309}. Die bekendste geval is penisillamiendisulfied:



Fava en medewerkers^{108,109} het die steriese invloede van verskillende groepe op die volgende reaksie bestudeer:



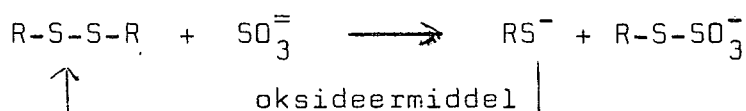
Hulle het gevind dat die struktuur van die groep R 'n groot rol in die reaksiesnelheid speel en dat steriese verhinderings, soortgelyk aan die neopentieleffek by koolstofatome, in hierdie reaksie ondervind word. Hierdie effek word duidelik geïllustreer deur hul resultate wat in die volgende tabel aangegee word:

R	$\frac{100 k_2(\text{R})}{k_2(\text{CH}_3)}$
CH_3^-	100
$\text{CH}_3\text{-CH}_2^-$	50
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH-} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	0.7
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C-} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	0.0006

k_2 = tweede orde-snelheidskonstante

Diarieldisulfiede soos difenioldisulfied³⁷⁶ en dibensioldisulfied²⁵⁴ word nie deur sulfiet gesplits nie. Onsimmetriese diarieldisulfiede met sterk elektrononttrekkende ariël-groepe, bv. 2,4-dinitrofeniel, word vinnig deur sulfiet gesplits, terwyl mono-nitrogesubstitueerde verbindings stadig reageer²⁷⁰. Dialkioldisulfiede wat amino- of karboksiel-groepe bevat, bv. sistien^{56,64,309,342}, homosistien²⁴⁷, sistamien³⁰⁹ en ditiodiglikolsuur³⁴³, word maklik deur sulfiet gesplits.

Ten slotte kan genoem word dat die tiol wat in die sulfitolise gevorm word, in die teenwoordigheid van oksideermiddels heroksideer na disulfied wat dan weer deur sulfiet gesplits kan word. Kwantitatiewe omsetting van die disulfied na $R-S-SO_3^-$ is dus moontlik. Hierdie reaksie word dan ook dikwels gebruik om tiolsulfonate uit disulfiede te berei:

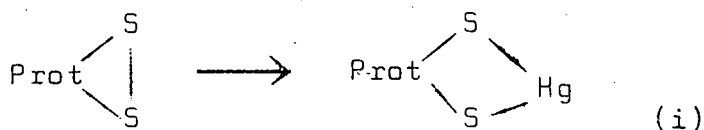


'n Hele aantal oksideermiddels kan gebruik word, soos waterstofperoksied³³², tetrionaat, jodosobensoaat^{13,14}, divalente koper³⁴⁷, of lugsuurstof met spore metaalione bv. Cu^{II} of Fe^{III} as katalisatore^{64,201}.

C. Reaksie van die disulfiedbinding in proteïene

Die reaksie van sulfiet met die disulfiedbindings van proteïene is taamlik gekompliseerd, want nie almal toon dieselfde reaktiwiteit nie. By sommige natuurlike proteïene reageer slegs 'n deel van die disulfiedgroepe met sulfietione -- volledige reaksie vind eers plaas na denaturering in die teenwoordigheid van swaarmetale⁵³.

Die disulfiedgroepe in natuurlike beesserum-albumien reageer bv. nie met sulfiet by pH 6.5 nie. Na denaturering met guanidien reageer slegs 12-13 disulfiedbindings/molekule, selfs al word die reaksie vir lang tye met hoë konsentrasies sulfietione uitgevoer. Die totaal van 17 disulfiedbindings/molekule reageer eers nadat 'n klein oormaat Hg^{++} bygevoeg is²⁰². Eksperimente met verskillende konsentrasies Hg^{++} gee dieselfde resultaat; dit dui op baie min direkte aanval van Hg^{++} op die disulfiedgroepe, en na bewering word 'n merkaptied van die tipe (i) gevorm wat dan verder met sulfietione reageer:



Azari⁶ het die invloed van denaturering deur ureum op die reaktiwiteit van die disulfiedbindings van lisosiem bestudeer en gevind dat die aantal disulfiede wat deur sulfietione gesplits word, toeneem met toenemende ureum-konsentrasie. Gepaard hiermee vind daar ook 'n progressiewe deaktivering van die lisosiem plaas.

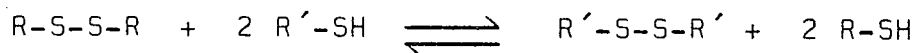
Die reaksie van sulfietione met die disulfiedgroepe in 'n hele aantal proteïene is reeds ondersoek^{55,59,203,212,372}. Die aantal disulfiedgroepe per molekule wat met sulfiet alleen reageer, is bepaal, asook die totale aantal disulfiedgroepe per molekule. Laasgenoemde is bepaal na reaksie met sulfiet + guanidien + merkurichloried. Die resultate is saamgevat in die volgende tabel:

Proteïen	Aantal S-S-bindings/molekule	
	Reaksie met SO_3^- alleen	Reaksie met SO_3^- + kwikverbinding
Oksitoksien	1.1	-
Ribonuklease	0.5	3.95
Insulien	1.9	3.05
Lisosiem	0.1	3.9
α -Chimotripsinogeen	0.8	4.7
α -Chimotripsien	3.1	4.7
Tripsinogeen	5.1	5.9
Tripsien	5.2	5.9
Beesserumalbumien	0.0	17.0
Pepsien	2.0	3.0

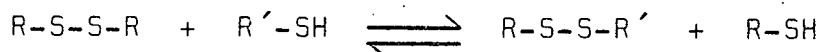
Uit bogenoemde tabel blyk dit dat die disulfiedbindings van heelparty proteïene stabiel is teenoor sulfietione in die afwesigheid van denatureringsreagense. Lisosiem en ribonuklease reageer feitlik nie met sulfiet nie terwyl by die meeste ander proteïene slegs 'n deel van die disulfiedbindings reageer. Die disulfiedbindings in proteïene verskil dus heelwat in hul reaktiwiteit teenoor sulfietione, en, soos voorheen genoem, bestaan daar nog onduidelikheid oor watter faktore almal die reaktiwiteit beïnvloed.

VII. TIOL-DISULFIEDUITRUILINGSREAKSIESA. Meganisme van die uitruiling

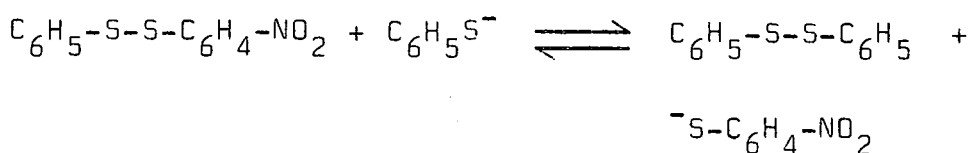
Die reaksie tussen tiole en disulfiede is van groot belang in biochemie. Vir baie jare is hierdie reaksie beskou as 'n eenvoudige oksidasie-reduksieproses:



Later het dit egter duidelik geword dat dié reaksie in twee stappe plaasvind en 'n S_N2 -meganisme¹²⁹ volg:



Die eerste geval waar tiol-disulfieduitruiling ondersoek is, is in 1920 deur Lecher^{221,224,225} gerapporteer:

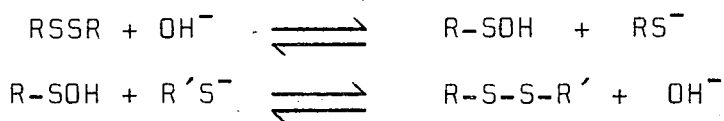


Die eerste kwantitatiewe bestudering van tiol-disulfieduitruiling is in 1937 deur Fredga¹³⁶ gepubliseer. Hy het die reaksie tussen (+) ditiodimelksuur en tiomelksuur polarimetries bestudeer en vasgestel dat dit 'n bimolekulêre uitruilingsreaksie is. In 1938 is die reaksie tussen L-sistien en tioglikolsuur polarimetries ondersoek deur Bersin en Steudel²⁸. Hulle het die ewewigskonstantes bepaal en aangetoon dat die reaksie deur die merkaptiedioon RS^- verloop, maar foutief afgelei dat die onsimmetriese disulfied baie onstabiel is en nie by die ewewig in enige noemenswaardige kwantiteite teenwoordig is nie, soos wel later bewys sou word²⁰⁴.

Die ewewigskonstantes vir talle tiol-disulfied-sisteme is reeds bepaal en dit is bewys dat daar hoë konsentrasies onsimmetriese disulfiede by ewewig bestaan^{97,98,111,204,211}. Dit is vir 'n geruime tyd aanvaar dat die uitruilingsreaksie deur die merkaptiedioon RS^- verloop^{155,183,185,360}, en later is dit dan ook deur kinetiese studies bevestig^{28,111}. Die snelheidskonstante vir die reaksie van sistien met tioglikolsuur is bv. 10^4 keer groter vir die RS^- -vorm as vir die RSH -vorm²¹¹ en die reaksiesnelheid word gegee deur:

$$V = k [RSSR] [R'S^-]$$

Omdat hierdie uitruilingsreaksie basis-gekataliseer is, is daar nog 'n meganisme waarvolgens dit moontlik kan verloop:



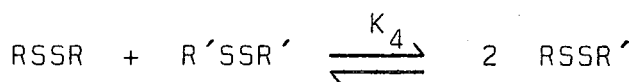
Fava¹¹¹ het egter daarin geslaag om te bewys dat die reaksie nie so verloop nie, maar wel deur 'n aanval van die merkaptiedioon op die disulfied.

Tiol-disulfieduitruiling kan soms wel deur middel van 'n vry radikaalmeganisme plaasvind. So is bv. gevind dat ultravioletlig die uitruiling tussen tiokresol en ditolielidisulfied kataliseer¹⁵⁹.

Die ewewigskonsentrasies van onsimmetriese disulfiede in tiol-disulfiedsisteme word bepaal deur die twee ewewigskonstantes K_2 en K_3 :

$$\begin{aligned} K_2 &= \frac{[\text{RSSR}][\text{RS}^-]}{[\text{R}'\text{S}^-][\text{RSSR}]} \\ K_3 &= \frac{[\text{R}'\text{SSR}'][\text{RS}^-]}{[\text{R}'\text{S}^-][\text{RSSR}']} \\ \therefore \frac{K_2}{K_3} &= K_4 = \frac{[\text{RSSR}]^2}{[\text{RSSR}][\text{R}'\text{SSR}']} \end{aligned}$$

K_4 is dus die ewewigskonstante vir die disulfiedsisteem:



Die ewewigskonstantes K_2 en K_3 is vir 'n hele aantal tiol-disulfiedsisteme bepaal en by almal is gevind dat $K_2 > 1$ en $K_3 < 1$, wat beteken dat daar by ewewig hoë konsentrasies onsimmetriese disulfiede teenwoordig is. Die volgende tabel gee gepubliseerde waardes⁹⁹ van die ewewigskonstantes K_2 en K_3 vir 'n aantal tiol-disulfiedsisteme aan:

	K_2	K_3
Sisteamien-sistien	4.76	0.75
Sisteamien-glutatioon-disulfied	5.00	0.34
N-dimetielsisteamien-sistien	2.30	0.36
N-dimetielsisteamien-glutatioondisulfied	1.56	0.32
Glutatioon-N.N'-tetraasetielsistamien	4.23	0.47
Glutatioon-sistamien	12.80	0.20

In die geval van die glutatioon-sistamien-sisteem is $K_2 \gg 1$ en $K_3 \ll 1$, sodat K_4 baie groot is. Dit is dan ook gevind dat die onsimmetriese disulfied in groot hoeveelhede gevorm word.

B. Redokspotensiale van tiol-disulfiedsisteme

Foss¹²⁵ het aangetoon dat daar 'n noue verband bestaan tussen die oksideerbaarheid en die S-nukleofiliteit (tiofiliteit) van sekere anione:



Hoe laer die oksidasiepotensiaal van die sisteem $2 \text{XS}^-/\text{XSSX}$ is, hoe groter is die basiese sterkte of S-nukleofiliteit van XS^- gewoonlik. Alhoewel Foss in staat was om by 'n hele aantal gevalle die reaksieverloop suksesvol te voorspel, was dit nie so maklik in die geval van tiol-disulfiedsisteme nie. By hierdie sisteme is die oksidasiepotensiale van die verskillende merkaptiedgroepe baie klein, moeilik bepaalbaar en verskil ook nie veel van mekaar nie. Talle pogings is al aangewend om die oksidasiepotensiaal vir tiol-disulfiedsisteme te bepaal. Die probleem is dat daar nog geen elektrodesisteme beskikbaar is wat omkeerbaar is ten opsigte van die tiol-disulfiedsisteme nie en selfs platinelektrodes vorm 'n lagie stabiele merkaptied wat die omkeerbaarheid van die elektrode ondermyn. Die beste bepalingmetode wat tans beskikbaar is, maak gebruik van 'n jodium-jodiedsisteme wat in ewewig met die tiol-disulfiedsisteme verkeer²⁹³. Hier word aangeneem dat die swaai elektro-onaktief is en dus nie die elektrode affekteer nie. Die aanname is ook gemaak dat die elektrodepotensiaal heeltemal via die jodium-jodiedsisteme bepaal word. Hierdie werk is later gekritiseer¹³⁷ op grond van die feit dat jodium met tiele kan reageer om ander produkte benewens disulfiede te vorm. Alhoewel daar dus onsekerheid bestaan oor die absolute waardes van redokspotensiale wat deur middel van bogenoemde metode bepaal is, het hierdie waardes heelwat betekenis in die gevalle waar slegs 'n vergelyking van die reduksievermoë van tiele nodig is.

Die volgende tabel gee die reduksiepotensiale aan vir 'n aantal tiol-disulfiedsisteme, soos bepaal⁴⁶ volgens bogenoemde metode:

<u>Tiol</u>	<u>E'_0 (vs. N.W.E.) (pH 7.0)</u>
Tioglikolsuur	-0.15
Sisteïen	-0.15
Tiolhistidien	-0.10
Merkaptoëtanol	-0.07
Ergotionien	-0.06
Glutatioon	+0.03
Tiofenol (in 70% etanol)	-0.31
o-Tiokresol (in 70% etanol)	-0.12

Van bogenoemde reeks tirole is tiofenol die beste reduseermiddel. Hierteenoor is glutatioon die swakste reduseermiddel, m.a.w. dit is baie maklik om glutatioon-disulfied te reduseer. Hierdie besondere eienskap van glutatioon speel 'n groot rol in baie biologiese prosesse⁴⁶.

Die probleem van omkeerbare elektrodesisteme het die vordering in hierdie veld net tydelik vertraag en spoedig is oorgegaan tot ander tegnieke om die oksidasiepotensiale van tiol-disulfiedsisteme te bepaal. So bv. het Eldjarn en Pihl⁹⁷ ewewigstudies op tiol-disulfied-uitruilings uitgevoer en gevind dat die volgende verband tussen die sisteme bestaan:

$$E'_0 \text{ RSSR/RSH} = E'_0 \text{ R'SSR'/R'SH} - 0.0307 \log (K_2 K_3)$$

$$E'_0 \text{ R'SSR'/RSH, R'SH} = E'_0 \text{ R'SSR'/R'SH} - 0.0307 \log K_2$$

Wanneer die ewewigskonstantes K_2 en K_3 vir die sisteme (R-SH + GSSG) en (R-SH + sistien) bekend is, kan die verband tussen die redokspotensiaal van sistieën en dié van glutatioon bereken word. Volgens hierdie metode is die redokspotensiaal van sistieën 0.01 volt hoër as dié van glutatioon, wat egter teenstrydig is met die waardes wat deur Calvin⁴⁶ verskaf is. (Hierdie potensiaal is relatief tot dié van glutatioon en nie tot die normale waterstofelektrode nie.)

Kolthoff en sy medewerkers³⁵³ het ook baie bygedra om die kennis van hierdie sisteme uit te brei. Deur middel van spektrofotometriese studies het hulle die ewewigte tussen ferro- en ferri-yster en sistien-sistieën bepaal en hiervan bereken dat die reduksiepotensiaal van die sistien-sistieënsistiem -0.33 volt is by 25°C en pH 7.0. Dit stem ooreen met waardes verkry vanaf potensiometriese studies^{149,158}. Asook met waardes bereken uit termodinamiese data³⁵. Net so stem die waarde van die reduksiepotensiaal wat deur polarografiese studies²⁰⁵ verkry is, ook goed met bogenoemde waarde ooreen.

Reeds in 1937 is gewys²⁶² dat die polarografiese halfgolfpotensiaal $E_{1/2}$ van 'n omkeerbare oksidasie-reduksiesistiem in 'n goed gebufferde oplossing die E'_0 van die sistiem weergee. Dit geld vir eenvoudige tiol-disulfiedsisteme, en onlangs is bewys dat dit ook van toepassing is op die disulfiedbindings in proteïene⁶⁰. Insulien gee bv. 'n reduksiegolf by pH 1.1 met 'n halfgolfpotensiaal van -0.244 volt (vs. N.W.E. by 25°C). $E_{1/2}$ by pH 7 is -0.38 volt (vs. N.W.E.) en omdat die reduksie heeltemal omkeerbaar is, moet dit ook die reduksiepotensiaal E'_0 wees by pH 7. Hierdie

waarde stem goed ooreen met dié van sistien wat volgens ander metodes bepaal is^{65,137}.

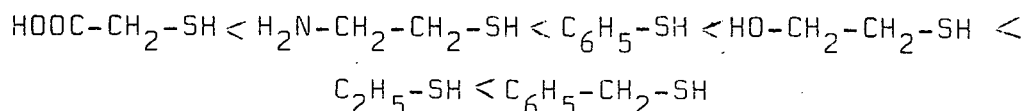
Daar bestaan aansienlike verskille in die reduksiepotensiale van disulfiedbindings in proteïene^{60,373}. So bv. word die twee interkettingdisulfiedbindings van insulien by bogenoemde potensiaal gebreek, terwyl die intrakettingdisulfied eers by 'n effens hoër potensiaal gereduseer word. Die verskil in die reduseerbaarheid van disulfiedbindings kan egter nie altyd toegeskryf word aan die verskil tussen inter- en intrakettingbindings nie, want dit is bv. gevind dat die vier intrakettingdisulfiedbindings in ribonuklease heelwat verskil wat betref hul reduseerbaarheid. Daar is aangevoer dat omgewingsfaktore ook 'n invloed op die reduksiepotensiale moet hê.

Die reduksiepotensiale van kleiner disulfiedmolekules soos glutatioon en ditioglikoloesuur lê skynbaar baie na aan dié van sistien. Kolthoff²⁰⁴ het dit in beide gevalle met behulp van ewewigstudies bepaal en 'n waarde van -0.32 volt gevind, wat goed ooreenstem met die waardes wat deur Ghosh¹⁴⁸ verskaf is. Hoewel daar heelwat werkers was wat beweer het dat die reduksiepotensiale van glutatioon en sistien baie laer is as -0.32 volt, dui die jongste inligting tog op 'n reduksiepotensiaal van die orde -0.33 tot -0.39 volt vir die meeste disulfiedbindings^{65,137}.

Daar bestaan nog nie duidelikheid oor presies wat die verband is tussen reduksiepotensiale en die reduksievermoë van tiale soos dit eksperimenteel ondervind word nie. Daar is beweer²⁴² dat die reduksievermoë van tiale as volg toeneem:

tersiêre tiale < sekondêre tiale < primêre tiale < aromatiese tiale.

Dit stem nie ooreen met die bevindings van Maclaren nie²⁴⁰. Hy het in 'n ondersoek van die disulfiedbindings in wol gevind dat die reduksievermoë van 'n reeks tiale as volg toeneem:



Daar bestaan geen korrelasie tussen die reduksievermoë van bogenoemde tiale en hul reduksiepotensiale nie²⁴⁰. Verder is dikwels beweer dat penetrasie die reaksies by wol behoort te beïnvloed omdat groter molekules dié vesel moeiliker binnedring as kleiner molekules. Uit bogenoemde

reeks blyk egter dat een van die grootste molekules, nl. bensielmerkaptaan, in werklikheid die beste reduseermiddel is. Daar bestaan ook die moontlikheid dat die dissosiasie van die tiol hul reduksievermoë kan beïnvloed, maar Maclaren kon geen korrelasie vind tussen die pK-waardes van die tiolgroepe en die reduksievermoë van die verskillende tiol nie.

Skygbaar is die reduksieproses baie ingewikkeld. Benewens die reduksiepotensiaal van die tiol moet talle ander faktore soos pK-waardes, geaardheid van die tiol, adsorpsie en stereochemiese verhinderings die reaksie beïnvloed.

C. Faktore wat die reaksiesnelhede by tiol-disulfied-uitruiling beïnvloed

(i) Die geaardheid van die disulfied speel 'n belangrike rol in die reaksiesnelheid. Na bewering³⁸ word die reaktiwiteit van disulfiede beïnvloed deur strukturele faktore en ook deur die netto lading op die disulfiedmolekule. Gevolglik vind reaksie makliker plaas tussen twee teenoorgesteld gelaaiete molekules as tussen twee identiese gelaaiete of twee ongelaaiete molekules⁵⁸. So bv. is die snelheidskonstante vir die reaksie van glutatioon met sistamien 300 maal groter as vir die reaksie van glutatioon met diasetielsistamien.

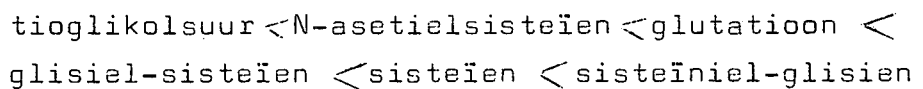
Ten spyte van hierdie verskille in reaksiesnelhede is die reaksie van glutatioon met disulfiede by fisiologiese pH-waardes nogtans baie vinnig. So bv. word 8% van die disulfied binne die eerste sekonde gereduseer in die reaksie van 0.001 M glutatioon met 0.001 M N,N'-diasetielsistamien⁹⁸.

(ii) Die geaardheid van die verplasende merkaptiedgroep, $Y-S^-$, het ook 'n groot invloed op die reaksiesnelheid. Dit is bewys dat die uitruiling nie deur die merkaptaan YSH verloop nie, maar wel deur die merkaptiedioon YS^- . Gevolglik word die reaksiesnelheid bepaal deur die hoeveelheid $Y-S^-$ wat beskikbaar is by die pH waarby die reaksie uitgevoer word, d.w.s. dit word bepaal deur die pK-waarde van die merkaptaan.

Die ionisasie van merkaptane by fisiologiese pH-waardes behoort dus 'n aanduiding van hul biologiese aktiwiteite te gee. Die volgende tabel, geneem uit die publikasie van Benesch en Benesch²², gee die persentasie ionisasie van 'n aantal tiol by pH 7.4 aan:

Merkaptaan	% RS ⁻ by pH 7.4
Sisteïenetielester	16
Sisteïniel-glisien	11
Sisteamien	11
Sisteïen	6
Glutatioon	1
Homosisteïen	1
γ-Glutamiel-sisteïen	1
Tioglikolsuur	0

Daar bestaan 'n baie goeie korrelasie tussen bogenoemde ionisasiewaardes en die snelheid van deaktivering van anti-biotiese middels, soos streptomisien, deur merkaptane. Cavallito⁵² het bv. gevind dat die deaktivering deur 'n spesifieke tiol toeneem met 'n toename in pH van die oplossing. By 'n konstante pH neem die deaktivering as volg toe vir 'n reeks tiole:



Dit dui beslis daarop dat die merkaptiedioon die reaktiewe spesie by die uitruilingsreaksie is.

Alhoewel die reaksiesnelheid bepaal word deur die pK-waarde van die tiolgroep, is dit belangrik om daarop te let dat die verskille in reaksiesnelhede van twee tiolgroepe met verskillende pK_{SH}-waardes by 'n gegewe pH kleiner kan wees as wat verwag is, omdat die hoër konsentrasie merkaptiedione van die groep met laer pK_{SH} na bewering opgehef word deur die groter nukleofiele reaktiwiteit van die ione van die groep met die hoër pK_{SH}-waarde⁵⁸.

So het Fava¹¹¹ gevind dat die snelheidskonstante vir die reaksie tussen n-butaanmerkaptied en trimetieleendisulfied 650 keer groter is as die van die merkaptied van tioglikolsuurmetielester, ten spyte van die feit dat die pK-waarde van n-butaantiol (pK = 13) heelwat hoër is as die van tioglikolsuurmetielester (pK = 8). Dit blyk dus dat elektrononttrekkende groepe in die molekule die elektron-digtheid op die swaelatoom verlaag en die ioon minder nukleofiel maak.

Eldjarn⁹⁹ het die reaksiesnelhede van sistien met 'n aantal sisteïen- en sisteamienderivate by pH 7.4 ondersoek

en gevind dat dit ongeveer dieselfde is in die meeste gevalle. Die pK -waardes van die tiol wat gebruik is, varieer van 7.7 (penisillamien) tot 10.1 (homosisteïen), en gevolglik bestaan by pH 7.4 ongeveer 50% van eersgenoemde tiol in die geïoniseerde vorm, terwyl slegs 0.2% van laasgenoemde geïoniseerd is. Hiervan het Eldjarn afgelei dat by 'n gegewe pH die afname in konsentrasie van merkaptiedione met toenemende pK_{SH} -waarde effektief gekanselleer word deur 'n toename in nukleofiele reaktiwiteit van die merkaptiedioon.

Aromatiese tiol soos tiofenol, 2,4-dinitrotiolenol en ergotioneïen vorm na bewering nie onsimmetriese disulfiede met sistien nie en stel ook geen sisteïen vry nie, selfs al word 'n oormaat tiol gebruik⁹⁹. Dit beteken dat die ewewigte in sulke sisteme ver na links verplaas is, m.a.w. dat die redokspotensiale van die aromatiese tiol heelwat hoër is as die van sistien/sisteïen. By aromatiese tiol word die merkaptiedgroep gestabiliseer deur resonansie van die π -elektrone van die ringstruktuur, wat dan ook hul lae pK_{SH} -waardes verklaar.

Dit is noodsaaklik om hier te wys op die gebruik om sekere spesifieke pK -waardes aan tiolgroepe toe te ken, sonder dat daar sekerheid bestaan oor die korrektheid hiervan. In die voorafgaande literatuuroorsig word hierdie gebruik telkens opgemerk. Dit kan soms baie misleidend wees en tot 'n foutiewe vertolking van resultate lei. Die bepaling van die dissosiasiekonstantes van die merkaptaangroepe van eenvoudige alkiel- en arieltiol lewer nie veel probleme op nie en die pK -waardes van 'n groot aantal tiol is dan ook bekend^{46,208}. Dit lê gewoonlik in die gebied van 9.5 - 10.5. Indien die molekule 'n aminogroep sowel as 'n merkaptaangroep bevat, word die saak meer gekompliseer omdat dit moeilik is om vas te stel watter proton eerste sal dissosieer^{38,58}. In 'n molekule soos sisteamien ($H_3N^+-CH_2-CH_2-SH$) word die pK -waarde van die SH-groep verlaag deur die invloed van die positiewe lading op die aminogroep. Terselfdertyd is die pK -waarde van die NH_3^+ -groep hoër as bv. dié van etielamien as gevolg van die negatiewe lading op die swaelatoom. Dit word teenswoordig aanvaar²² dat pK_1 die dissosiasiekonstante van die SH-groep en pK_2 dié van die NH_3^+ -groep is in bogenoemde geval.

Bevat die molekule verder ook 'n COOH-groep, soos sisteïen ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-SH}$) dan word die suursterkte van die aminogroep verder verhoog omdat die induktiewe invloed van die karbonielgroep groter is as die elektrostatische effek van die negatiewe lading²². Dit bring die ionisasie van die aminogroep in dieselfde gebied as dié van die SH-groep, met die gevolg dat dit nou nie meer moontlik is om pK_2 en pK_3 aan die SH- of NH_3^+ -groepe toe te skryf nie. (Cannan⁵⁰ het bewys dat pK_1 wel die pK-waarde van die COOH-groep is in die geval van sisteïen).

In 'n poging om bogenoemde probleem te oorbrug, is sekere aannames gemaak, met behulp waarvan die dissosiasiekonstantes dan indirek afgelei word. Die meeste navorsers moes egter erken dat hierdie metodes slegs benaderde waardes gee, met die gevolg dat hierdie kwessie nog glad nie opgeklaar is nie^{92,144,228}.

In die volgende lys word die gepubliseerde pK-waardes vir 'n aantal tiol aangegee:

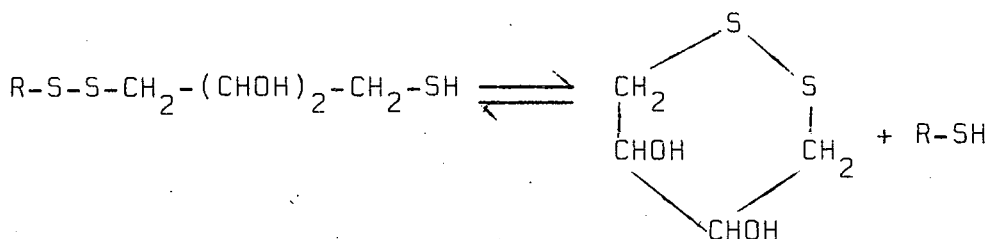
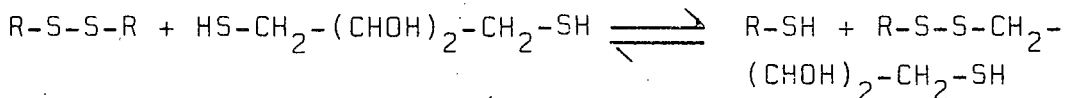
Tiol	pK	Ref.	Tiol	pK	Ref.
Merkaptoëtanol	9.58	76	Sisteamien	8.10	76
Etielmerkaptaan	10.50	76		8.35	22
Bensielmerkaptaan	9.43	208		8.40	58
Fenielmerkaptaan	6.52	208	Sisteïen	10.28	67
	7.78	76		8.70	76
β -Merkaptopropioonsuur	10.05	138		8.15	138
Tioglikolsuur	10.20	80		8.30	46
	10.12	236		10.78	35
	10.06	76		8.32	76
Homosisteïen	8.70	138	Glutatioon	9.62	277
	10.00	22		8.56	138
N-formielsisteïen	9.50	58		8.70	46
N-asetielsisteïen	9.52	138		9.20	22

Uit bogenoemde tabel is dit duidelik dat daar nog glad nie eenstemmigheid heers oor die pK-waardes van tiolgroepe in molekules wat hiermee saam ook karboksielsuur- en aminogroepe bevat nie. In proteïene, wat heelwat meer gelaaiede groepe bevat, word die saak verder gekompliseer deurdat waterstof- en hidrofobiese bindings ook die ionisering van die tiolgroep kan beïnvloed^{212,301}. Daar is beweer dat die tiolgroepe van hemoglobien bokant pH 10 eers begin dissosieer³³¹.

D. Verdere aspekte van tiol-disulfieduitruiling

By sommige tiol-disulfiedsisteme word daar besonder hoë persentasies onsimmetriese disulfiede gevorm. Volgens Eldjarn⁹⁹ kan die termodinamiese stabiliteit van hierdie onsimmetriese disulfiede nie toegeskryf word aan 'n groter sterkte van die disulfiedbinding nie en behoort die asimetrie van so 'n disulfied die binding eerder te ver-
swak. Dit blyk dat hierdie onsimmetriese disulfiede gesta-
biliseer word deur waterstofbindings. In die geval van die
onsimmetriese disulfied glutatïoon-sisteme word waterstof-
bindings tussen die aminogroep van die γ -glutamiel- en die
karboksiesuurgroep van die sisteïnelreste onderskeidelik
gevorm. Dit kan moontlik verklaar waarom sommige tiole nie
in vivo beskerming teen ioniserende straling verskaf nie,
want geeneen van die nie-beskerende tiole is in staat om
waterstofbindings te vorm nie.

Sikliese disulfiede speel soms 'n besondere rol by
tiol-disulfieduitruilings^{111,220,357}. So 'n geval word
gevind by 1,4-ditiotreitol⁶⁶. Hierdie ditiol kan na bewering
vry sistien kwantitatief na sisteme reduseer, terwyl dit
self na 'n sesledige sikliese disulfied geoksideer word:

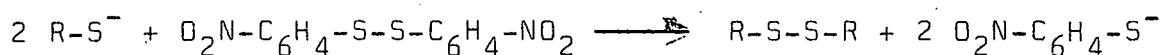


Die sikliese disulfied is glo die meer stabiele vorm en
gevolglik word die ewewig heeltemal na regs verplaas.
Hierdie reduksiemetode word tans suksesvol gebruik om
sistengroepe in wol te reduseer, selfs in die afwesigheid
van denatureringsreagense³⁷¹.

Daar is beweer⁹⁹ dat sikliese disulfiede, soos
lipoïensuur, nie met tiole reageer nie. Wanneer die
gereduseerde vorms van lipoïensuur of 2,3-ditioopropanol
egter met 'n disulfied soos sistien reageer, verloop die
reaksie kwantitatief na regs en word die ooreenkomstige
sikliese disulfied en sisteme gevorm, met slegs spore
onsimmetriese disulfied daarby. Hierdie reaksie is moeilik
verklaarbaar indien aanvaar word dat daar wel heelwat spanning
in die ring van lipoïensuur bestaan, soos voorheen beweer
is²⁸⁵.

E. Enkele toepassings van die tiol-disulfieduitruilings-reaksie

Die bepaling van tiolgroepe deur middel van tiol-disulfieduitruiling het die afgelope paar jaar heelwat veld gewen²⁹⁸. In 1958 het Ellman¹⁰¹ 'n metode vir die bepaling van tiole beskryf wat op die volgende reaksie gebaseer is:



Die aantal p-nitrotiofenolione wat in bogenoemde reaksie gevorm word, is 'n funksie van die aantal R-S-ione wat oorspronklik teenwoordig was. Omdat die absorpsiespektrum van die merkaptiedioon $O_2N-C_6H_4-S^-$ (absorpsiepiek by 412 m μ) totaal verskillend is van dié van die oorspronklike disulfied (absorpsiepiek by 320 m μ), en aangesien bewys is dat bogenoemde reaksie kwantitatief verloop, kan die oorspronklike tiolkonsentrasie vasgestel word deur die kolorimetriese bepaling van $O_2N-C_6H_4-S^-$. Later het Ellman¹⁰² oorgeslaan na die gebruik van 'n ander reagens, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobensoësuur) (DTN) wat net soos bis-(p-nitrofeniel)-disulfied met tiole reageer en op 'n soortgelyke manier bepaal kan word. Die voordeel van DTN is dat dit wateroplosbaar is en nie hoë konsentrasies aseton benodig om op te los soos bis-(p-nitrofeniel)disulfied nie. Die gevolg is dat dit gebruik kan word vir die kwantitatiewe bepaling van tiolgroepe in biologiese materiale. 'n Nadeel van hierdie tipe bepaling is dat dit nie kwantitatiewe resultate gee vir die tiolinhoud van natuurlike proteïene nie¹⁹⁶.

Linko²²⁹ het op 'n soortgelyke manier die aantal tiolgroepe in koringmeel bepaal met 2,2'-dihidroksi-6,6'-dinaftieldisulfied. 'n Baie interessante bepaling metode is dié wat deur Bitny-Szlachto^{31,32,87,182} ontwikkel is. Hy het 'n onsimmetriese disulfied (β -hidroksiëtiel-2,4-dinitrofenieldisulfied) gebruik om SH-groepe in proteïene soos aktien, albumien en miosien te bepaal. Bogenoemde disulfied reageer kwantitatief met tiole en vorm 2,4-dinitrotiofenol wat spektrofotometries bepaal word.

Verder berus talle oksidasies en reduksies op tiol-disulfieduitruiling. Die oksidasie van merkaptiede^{61,125}, xantate⁴⁹, ditiokarbamate¹¹⁷ en tiobensoate⁴⁸ na disulfiede deur tetranaat, die oksidasie van xantate en ditiokarbamate na disulfiede deur bis-(dimetoksifosfiniel)disulfied¹²⁴ behels almal tiol-disulfieduitruilings. Hierdie reaksie

vind ook 'n toepassing in die industrie by die rekspanningsverlaging van polisulfiedrubbers³³⁸ en in die permanente golwing van hare³⁸⁴. Dit is egter veral op die gebied van die biochemie dat hierdie reaksie 'n baie belangrike rol speel. Dit sluit o.a. die studie in van die disulfiedkruisbindings van insulien²⁹⁵, 'n studie van die fisiologiese aktiwiteit van hormone soos oksitoksien en vasopressien⁹⁰, asook 'n ondersoek na die funksie en gedrag van reaktiewe en onreaktiewe tiolgroepe in proteïene⁸⁵.

F. Die rol wat tiol-disulfieduitruiling en onsimmetriese disulfiede in proteïene speel

(a) Die reduksie van disulfiedbindings in proteïene

'n Biochemiese reaksie wat dikwels bestudeer word, is die reduksie van die disulfiedbindings in proteïene deur tiole met 'n lae molekulêr gewig^{33,104,286,323,378}. Hierdie reaksie word gebruik om polipeptiedkettings wat deur disulfiedbindings aan mekaar gebind is, te skei vir amino-suurvolgordebepalings, by die studie van die rol wat tiol- en disulfiedgroepe in biologiese reaksies speel en ook by 'n ondersoek na die invloed van disulfiedbrûe op die driedimensionele struktuur van proteïene.

In baie gevalle word die disulfiedbindings van natuurlike proteïene slegs in 'n geringe mate deur tiole gereduseer, selfs al is 'n groot oormaat tiol teenwoordig. Ná denaturering vind reduksie makliker plaas; volledige reduksie van disulfiedbindings is dan ook verkry na denaturering deur hitte²⁵⁶ of in die teenwoordigheid van ureum^{133,227}, guanidien¹⁸⁶, of benattingsmiddels^{174,251}.

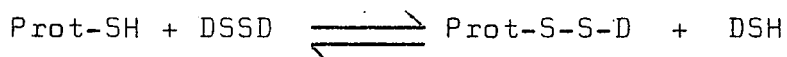
Beeserumalbumien bevat sewentien disulfiedbindings. In die natuurlike proteïen word slegs een van hierdie disulfiedbindings deur sisteamien²⁵¹ of tioglikol-suur¹⁸⁶ gereduseer, terwyl al sewentien gereduseer word in die teenwoordigheid van natriumdodesielsulfaat. So word ook net een van insulien se disulfiedbindings deur litium-tioglikolaat by pH 5 gereduseer, maar na denaturering in 8 M ureum kan al drie die disulfiedbindings gereduseer word. Onlangs is beweer³⁵⁸ dat die disulfiedbindings in proteïene wel kwantitatief deur tiole gereduseer kan word in die afwesigheid van denatureringsreagense, deur 'n groot oormaat tiol te gebruik. Op hierdie manier is al die disulfiedbindings in insulien, lisosiem en beesplasmaalbumien deur 4 M merkaptotaetanol (400-voudige oormaat) gereduseer in die afwesigheid van ureum. Aangesien die

reduksie 'n omkeerbare proses is, verplaas die oormaat tiol die ewewig na bewering heeltemal na regs en vind volledige reduksie plaas. Daar bestaan ook die moontlikheid dat denaturering as gevolg van die hoë konsentrasie merkaptöetanol die reduksie kan bevorder.

Dit is maklik om met behulp van reduksie vas te stel of die disulfiedbindings in 'n proteïen inter- of intrakettingbindings is. Bly die molekulêre gewig van die proteïen ná volledige reduksie onveranderd, is al die disulfiedbindings van die intrakettingtipe, maar as daar 'n afname in molekulêre gewig ondervind word met die vorming van meer as een polipeptiedketting, beteken dit dat sommige van die disulfiedbindings van die interkettingtipe is. Laasgenoemde is bv. die geval by insulien. Op hierdie manier is ook bewys dat die disulfiedbindings van lisosiem¹³³ en beesserumalbumien¹⁷⁴ almal intrakettinggebonde is.

(b) Die vorming van onsimmetriese disulfiede tussen tielgroepe van proteïene en tiole van lae molekulêre gewig

Heelwat onsimmetriese disulfiede tussen proteïene en tiole van lae molekulêre gewig is al berei. Kanarak¹⁸⁴ het 'n onsimmetriese disulfied van gereduseerde eierwitlisosiem en sisteïen berei. Verder is met behulp van radioaktiewe tioglikolaat bewys³³⁵ dat tot 4% van die disulfiede in wol in die onsimmetriese vorm bestaan na reduksie met tioglikolaat. Dit is ook bekend dat merkaptobarnsteensuur op 'n soortgelyke wyse met die sistiegroepe van wol³⁰⁸ reageer. Klotz¹⁹⁶ het gevind dat 'n onsimmetriese disulfied gevorm word in die reaksie tussen beesserumalbumien en die dinatriumsout van die gekleurde 2,2'-(2-hidroksi-6-sulfonaftiel-1-azo)difeniel-disulfied:



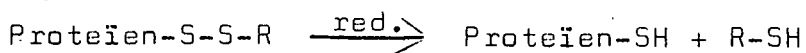
'n Soortgelyke reaksie is ondervind by β -laktoglobulien wat twee SH-groepe per molekule bevat¹⁹⁶. Alhoewel dit geen proteïen betref nie, is dit interessant om te meld dat 'n onsimmetriese disulfied tussen 'n getioleerde polisakkaried en sisteamien berei is deur 'n aantal Italiaanse navorsers⁸³.

Eldjarn en Pihl⁹⁶ het die reaksie tussen sistamien-³⁵S en proteïene ondersoek en gevind dat bees-

en mensserumalbumien, asook menshemoglobien en katalase die sistamien chemies bind deur middel van disulfied-bindings. Behandeling van hierdie onsimmetriese disulfiede tussen tiolgroepe van proteïene en sisteamien (proteïen-S-S-CH₂-CH₂-NH₂) met 'n oormaat sisteïen lei tot die vrystelling van die sisteamien. Bogenoemde proteïene bevat almal vry tiolgroepe en dit word aanvaar dat die onsimmetriese disulfied deur hierdie tiolgroep gevorm word. Insulien en sitochroom C bevat nie vry tiolgroepe nie en vorm onder soortgelyke kondisies ook geen onsimmetriese disulfiede met sisteamien of sistamien nie.

Die feit dat onsimmetriese disulfiede in vitro kan vorm tussen proteïene en tiol met lae molekulêre gewig, het daartoe gelei dat die vorming van sulke tipes verbindings in vivo ondersoek is. Dit is dan ook bewys⁹⁸ dat onsimmetriese disulfiede in vivo gevorm word tussen die serumproteïene, asook hemoglobien, en sisteamien-³⁵S wat in muise ingespuut is. Heelwat disulfiede van hierdie aard is reeds uit biologiese sisteme geïsoleer, o.a. die baie interessante onsimmetriese disulfied sisteïen-homosisteïen¹³⁹ uit die urien van pasiënte wat aan sistinurie ly.

Die onsimmetriese disulfied tussen ko-ensiem A en glutatioon is uit suurdeeg en ook uit varklewer geïsoleer^{63,336}. Verder bestaan daar 'n sterk moontlikheid dat kristallyne gliserinaldehyd-3-fosfaatdehidrogenase glutatioon mag bevat wat as onsimmetriese disulfied gebind is¹⁹⁹. Onlangs het Ferdinand¹¹⁵ bewys dat die simogeen van streptokokke-proteïnase een disulfiedgroep per molékule bevat en na reduksie is gevind dat hierdie disulfied 'n onsimmetriese een is:



(R-SH = ongeïdentifiseerde vlugtige tiol).

(c) Tiol-disulfieduitruiling in proteïene

Afgesien van bogenoemde uitruilingsreaksies vind daar ook nog meer subtiele uitruilings in proteïene plaas. Onder geskikte kondisies word disulfied-disulfieduitruilings in proteïene geïnisieer deur klein hoeveelhede tiol. Die tiol reageer met 'n disulfiedgroep om 'n nuwe disulfiedbinding te vorm, en terselfdertyd stel dit 'n verdere tiolgroep vry wat die proses kan voortsit¹⁷⁹.

Hierdie uitruiling kan soms drastiese veranderinge in die geaardheid van die proteïene veroorsaak en verskynsels soos die denaturering van proteïene word aan hierdie tipe uitruiling toegeskryf. So is bewys dat die een SH-groep van beesplasma-albumien 'n groot rol speel in die aggregering van hierdie proteïene, en dat die klonte gevorm deur termiese denaturering van natuurlike albumien verskil van die gevorm vanaf albumien waarvan die tiolgroep geblokkeer is¹⁸⁰. Huggins het beweer¹⁶⁹ dat die aggregering van bees- en mensserumalbumien om dimere en polimere te vorm, afhanklik is van tiol-disulfieduitruiling, aangesien hy gevind het dat hierdie dimere afgebreek word wanneer die proteïene met tiol behandel word³⁸¹. Verder is ook bewys dat die gelvorming van plasma-albumien, fibrinogeen, en γ -globulien in gekonsentreerde ureum afhanklik is van die teenwoordigheid van klein hoeveelhede tiolgroepe in hierdie proteïene, want gelvorming word uitgeskakel deur die blokkering van die tiolgroepe¹⁷⁰.

Jensen¹⁷⁹ het beweer dat daar by die denaturering van proteïene deur ureum 'n tiol-disulfieduitruiling plaasvind wat tot die vorming van 'n reëlmatige driedimensionele gelstruktuur lei. In die geval van denaturering deur warmte lei dit tot 'n sy-aan-sy-assosiasie omdat daar geen ureum teenwoordig is om die molekules van mekaar geskei te hou nie. Hierdie uitruilingsmeganisme by denaturering is bevestig in verdere ondersoek op proteïene soos ovalbumien²⁴⁶ en β -laktoglobulien²³¹.

Die presipitasie van proteïene met alkohole begunstig skynbaar ook tiol-disulfieduitruilings, want dit is bv. gevind dat die behandeling van beesplasma-albumien met koue alkohol (60%) veroorsaak dat die proteïene na 'n dimeer omskakel. Proteïene wat met joodasetamied behandel is om die tiolgroepe te blokkeer, reageer nie onder soortgelyke kondisies nie³⁴¹.

Dit is ook bewys dat die reologiese eienskappe van deeg 'n funksie is van die aantal disulfiedbindings wat dit bevat. Verwydering van die SH-groepe in deeg deur reaksie met N-etiilmaleïenimied maak die deeg taaiër deurdat tiol-disulfieduitruilings verhoed word¹³⁵.

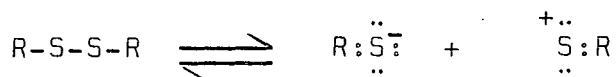
Dit is nou beslis bewys dat tiol-disulfieduitruiling ook in vivo plaasvind, en hierdie reaksie speel 'n rol in talle fisiologiese prosesse. Die stolling van

bloedfibrinogeen is 'n goeie voorbeeld hiervan²³². Deur middel van 'n tiol-disulfieduitruilingsreaksie veroorsaak die fibrien-stabiliserende faktor (FSF) kruisbinding van die oplosbare fibrien-s-molekule om die onoplosbare fibrien-i te vorm. Seldeling is nog 'n baie belangrike biologiese proses waarby hierdie uitruiling 'n rol kan speel. Onlangs is bewys dat uitruiling plaasvind tussen glutatioon en proteïendisulfiede gedurende die komplekse proses van mitose²⁴³. Die biologiese werking van die hormone vasopressien³²⁰ en insulien¹¹⁹ met weefsel behels waarskynlik ook 'n tiol-disulfieduitruiling.

VIII. DIE REAKSIE VAN ALKALI MET DIE
DISULFIEDBINDING

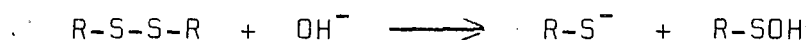
Die reaksie van die hidroksielioon met die disulfiedbinding is besonder ingewikkeld. Dit is die gevolg van sekondêre reaksies wat die reaksie so gekompliseerd maak dat die presiese reaksiemeganisme moeilik bepaal kan word.

Sommige navorsers³¹¹ het beweer dat die splitsing van 'n disulfiedbinding volgens 'n S_N1 -meganisme verloop:



Die twee gevormde fragmente kan na ander produkte ontbind: uit die negatief gelaaide deel vorm tiol as merkaptiedioon, terwyl die positief gelaaide deel op verskeie maniere kan stabiliseer, o.a. deur vry swael of H_2S af te splits.

Volgens die jongste inligting wat beskikbaar is, lyk dit egter nie asof 'n splitsing volgens 'n S_N1 -meganisme baie waarskynlik is nie²⁶⁹ en dit word tans algemeen aanvaar dat die reaksie 'n S_N2 -meganisme volg. Na analogie van die algemene vergelyking vir die nukleofiele splitsing van 'n disulfiedbinding behoort die reaksie met 'n hidroksielioon as volg te verloop:

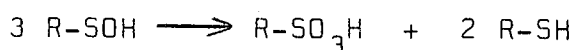
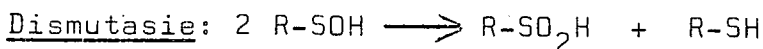
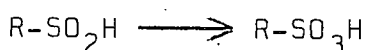
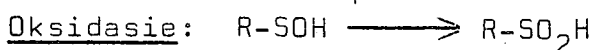
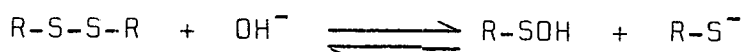


'n Merkaptiedioon sal dus uit die disulfied verplaas word, terwyl 'n sulfeensuur gevorm word. Dit is bekend dat sulfeensure besonder onstabiel is en in meer stabiele produkte oorgaan, sodat dit die splitsing sou aanhelp deur die ewewig na regs te verplaas. Dit is egter gevind dat die meeste disulfiede taamlik stabiel teenoor alkali is en dat splitsing nie maklik plaasvind nie. Die hidroksielioon is dus nie so 'n sterk tiofiele reagens as wat dikwels beweer word nie. Omdat OH^- egter 'n sterk affiniteit vir koolstof- en waterstofatome het, word die disulfiedbinding dikwels vernietig deurdat ander meganismes in werking tree.

Die enigste disulfiede waar 'n merkaptiedioon direk deur 'n hidroksielioon verplaas kan word, is die wat karboniel- of onversadigde groepe op 'n α -koolstofatoom het, asook diariëldisulfiede³¹¹. Na bewering⁷ is sulfeensure ($R-SOH$) by sommige van hierdie splitsingsreaksies geïdentifiseer, maar die bewyse wat aangevoer word, is nie baie oortuigend nie. Dit is bekend dat hierdie verbindings

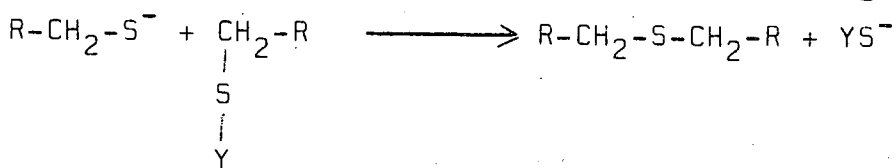
uiters onstabiel is en die enigste sulfeensure wat nog ooit gesintetiseer is, is die van antrakinoon en enkele van sy derivate⁴¹. Talle pogings is al aangewend om ander sulfeensure te berei, maar almal was onsuksesvol omdat hierdie verbindings vinnig disproporsioneer of oksideer na ander derivate.

In die meeste gevalle waar direkte nukleofiele splitsing van die disulfiedbinding wel plaasvind, word sulfiensure ($R-SO_2H$) en sulfoonsure ($R-SO_3H$) in die reaksiemengsel gevind en dit word aanvaar dat hulle die ontbindingsprodukte van die sulfeensure is³⁰³. Laasgenoemde kan deur oksidasie of dismutasie omgeskakel het na sulfien- en sulfoonsure en die reaksieverloop waarskynlik as volg:-



In die geval van diarieldisulfiede veroorsaak elektrofile groepe in die benseenring dat die disulfiedbinding makliker deur alkali aangeval word. So bv. moet difenioldisulfied tot hoë temperature verhit word met alkali om splitsing te bewerkstellig^{281,303}, maar wanneer NO_2 - of $COOH$ -groepe in die benseenring gesubstitueer word, vind die reaksie selfs by kamertemperatuur plaas^{270,313}. Die posisie van die elektrononttrekkende groepe in die benseenring beïnvloed ook die reaksiesnelheid. Diarieldisulfiede met 'n meta-gesubstitueerde $COOH$ -groep word bv. baie vinniger deur alkali gesplits as dié met 'n orto-gesubstitueerde groep³²⁹.

Nog 'n interessante reaksie wat moontlik volgens 'n S_N2 -meganisme kan verloop, is die vorming van lantionien wanneer sistien deur 'n nukleofiele reagens aangeval word. Hierdie reaksie verloop na bewering¹⁹⁰ soos volg:-



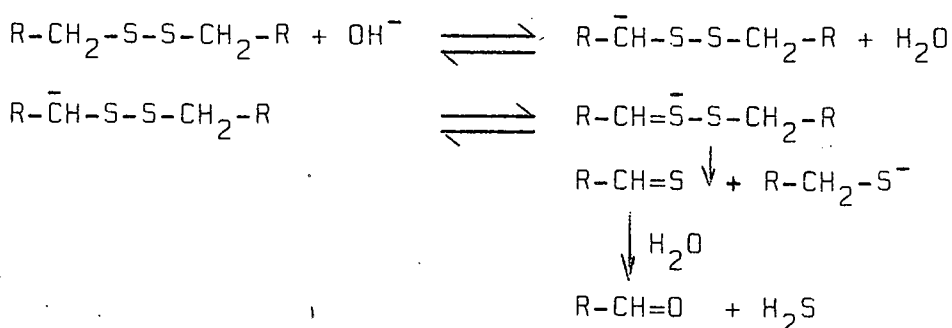
Soms word gevind dat lantionien gedurende tiol-disulfied-uitruilings in proteïene gevorm word en Zahn^{386,388,389}

het aangevoer dat dit volgens bogenoemde meganisme plaasvind.

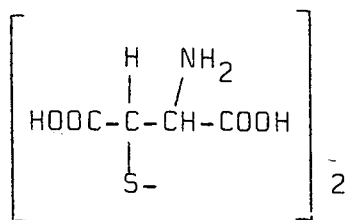
Die hidroksielioon is nie so 'n sterk tiofiele reagens as bv. CN^- of SO_3^- nie²⁸³. Dit het egter 'n sterk affiniteit vir koolstof- of waterstofatome en in die gevalle waar daar geen direkte nukleofiele verplasing van merkaptied deur OH^- plaasvind nie, kan die disulfied nogtans deur ander reaksiemeganismes vernietig word. Hier bestaan verskeie moontlikhede:-

(i) Ionisasie van 'n α -waterstofatoom:

Dit is bekend²⁸⁹ dat disulfiede soos sistien 'n α -waterstofatoom in 'n basiese medium kan verloor. Omdat swaël 'n vry 3d-orbitaal beskikbaar het, kan dit die ekstra elektrone van die gevormde karbanioon opneem en hidrolise van sistien kan dus as volg plaasvind:-



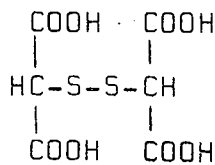
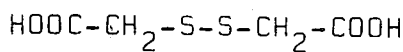
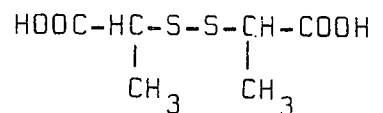
Rosenthal^{288,289} het die bewering gemaak dat die α -waterstofatoom 'n belangrike rol in hierdie splitsing speel en hy het dit ook geïllustreer met behulp van die volgende disulfied:



Bogenoemde verbinding is baie labiel teenoor alkali. Verplasing van al drie die groepe op die α -koolstofatoom deur metielgroepe gee hierteenoor 'n verbinding wat geen α -waterstofatome bevat nie en stabiel is teen alkali.

Schöberl³⁰⁶ het gevind dat disulfiede wat α -karboksiesuurgroepe bevat, besonder onstabiel is teenoor alkali. Elektrononttrekkende groepe verhoog dus die disulfiedbinding se labiliteit teenoor alkali en dit is gevind dat die volgende disulfiede almal deur alkali aangeval word met die vorming van karbonielverbinding en merkaptiedione:

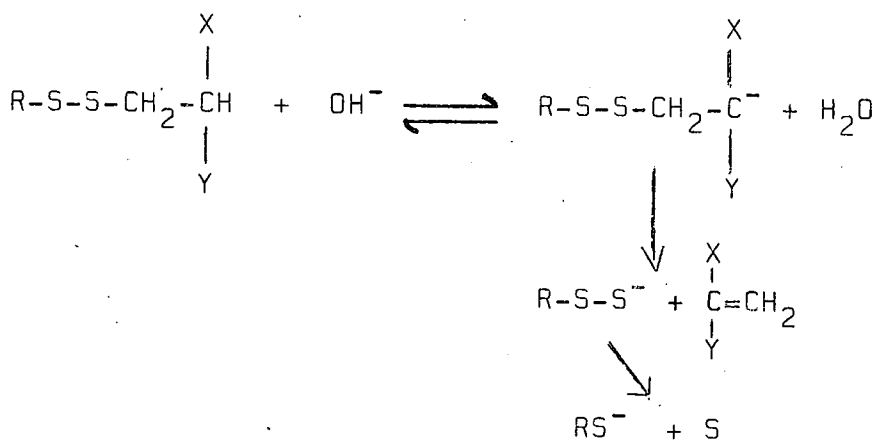


Dimalonzuur-
disulfiedDitiodiglikol-
suurDitiodimelk-
suur.

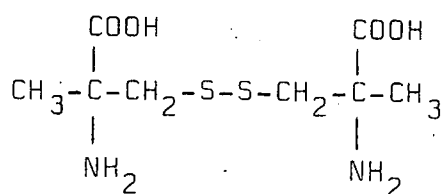
Dit is ook bewys dat aldehyede gevorm word gedurende die alkaliese hidrolise van wol en bogenoemde reaksiemeganisme behoort dus soms geldig te wees vir die afbreek van die sistienreste in wol²⁸⁹.

(ii) Ionisasie van 'n β -waterstofatoom:

'n Hele aantal navorsers^{24,58,263,356} het beweer dat die splitsing van 'n disulfied deur alkali volgens die volgende meganisme verloop:-



Die ionisasie van 'n β -waterstofatoom is die belangrikste stap in hierdie reaksiemeganisme en ionisasie sal bevorder word indien X en Y elektrononttrekkende groepe is. Dit is die geval by sistienbevattende proteïene²⁶⁹. Indien bogenoemde teorie korrek is, behoort disulfiede wat geen β -waterstofatome bevat nie, besonder stabiel teenoor alkali te wees. Dit is dan ook inderdaad die geval^{337,345}, want dit is bv. bewys dat β, β' -dimetielsistien

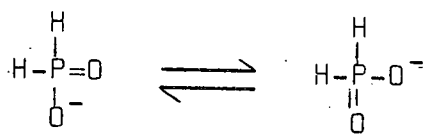


baie meer stabiel teenoor alkali is as sistien.

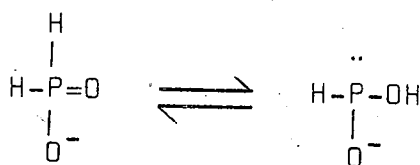
IX. DIE REDUKSIE VAN DISULFIEDBINDINGS DEUR HIPOFOSFIETIONE

Swanepoel (van hierdie laboratorium) het oorspronklik die bestudering van die reduksie van disulfiedbindings deur hipofosfietione begin³⁴⁸ en hierdie werk is 'n voortsetting daarvan. Aangesien genoemde outeur die elektroniese konfigurasie en rigtende eienskappe van fosfor volledig bespreek het, sal dit net kortliks hier aangestip word ter wille van die besprekings wat later volg.

Fosfor kom meestal in die vorm van p^3 - of sp^3 -gebonde geometriese sisteme voor^{206,250,364}. In hipofosforigsuur (H_3PO_2) is die bindings tetraëdries gerangskik ten opsigte van die fosforatoom en dit bring mee dat daar heelwat π -bindingskarakter in hipofosfietsoute voorkom. Die volgende resonansievorms kan dus bestaan:-



Afgesien van bogenoemde vorms bestaan daar ook 'n tautomere vorm waar die fosforatoom aan slegs drie ander atome gebind is:

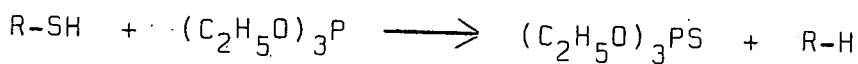


en wat in lae konsentrasies in hipofosforigsuuro oplossings teenwoordig is.

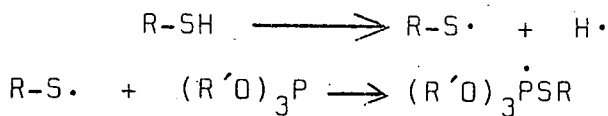
Swanepoel³⁴⁸ het dan ook aangeneem dat hipofosfietsoute en trivalente fosforverbindings op dieselfde manier reageer. Albei tipes verbindings bevat 'n ongedeelde 3s-elektronpaar wat hulle sterk reduserend maak as gevolg van fosfor se neiging tot sp^3 -hibridisering en die vorming van π -bindings. Verder is dit bekend⁴³ dat fosfor 'n sterk affiniteit vir swaelverbindings besit, waarskynlik as gevolg van fosfor se hoë polariseerbaarheid en grootte waardeur dit maklik die leë 3d-orbitaal van swael kan betrek.

Reaksie van trivalente fosforverbindings met tirole

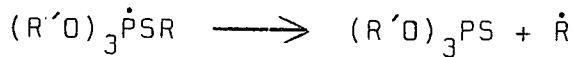
Dit is bekend dat trialkielfosfiete met tirole reageer om die ooreenstemmende koolwaterstof en die fosforotionaat te vorm¹⁶⁷. Hierdie reaksie vind plaas in die teenwoordigheid van lig of by verhoogde temperature:-



Na bewering³⁶⁷ word 'n intermediêre kwadrikovalente fosforaniëlradikaal gevorm deur 'n direkte aanval van 'n tiëlradikaal op die trivalente fosfor:-



Die afbou van die fosforaniëlradikaal word beheer deur die sterkte van die P=O- en P=S-bindings^{62,368}:-

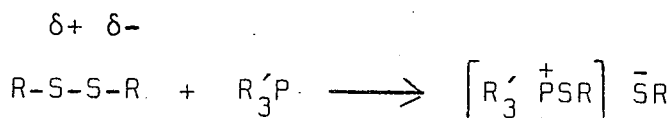


Reaksie van trivalente fosforverbindings met disulfiede

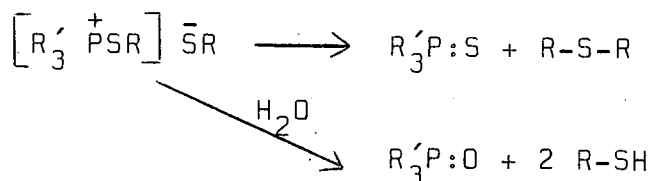
Die disulfiedbinding kan deur 'n hele reeks trivalente fosforverbindings gesplits word. Daar bestaan twee moontlike meganismes waarvolgens hierdie splitsing kan plaasvind, nl. 'n ioniese en 'n vry radikaalmeganisme.

(i) Ioniese meganisme:

Volgens hierdie meganisme word die disulfiedbinding gepolariseer en word die meer positiewe swael- atoom deur trivalente fosforverbindings aangeval om 'n dubbelsout te vorm:-



Laasgenoemde produk kan op twee maniere ontbind:

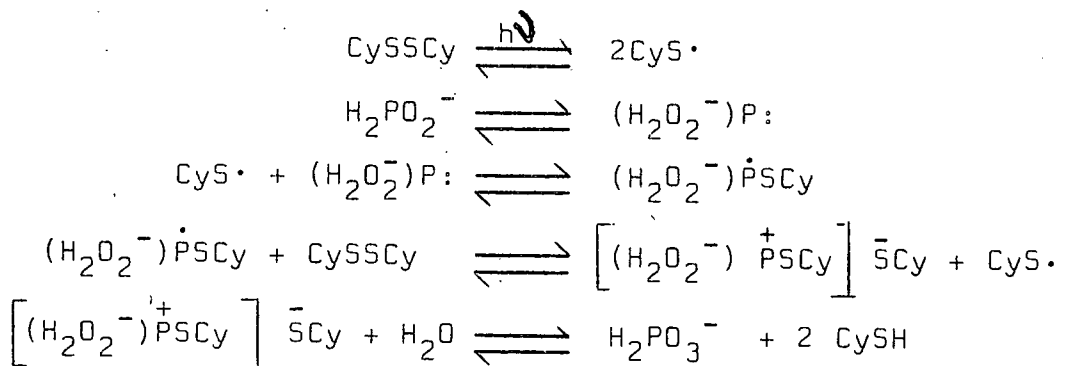


Hierdie ioniese splitsingsmeganisme word deur 'n hele aantal werkers^{61,175,252,259,260} as die korrekte aanvaar. Heelwat reaksies is bestudeer en talle bewyse is aangevoer waarom die splitsing 'n ioniese meganisme moet volg. Sommige werkers¹⁶⁸ het sover gegaan om te beweer dat 'n ioniese meganisme optree selfs in die gevalle waar homolise baie moontlik is, soos by fotolise. Met al die inligting wat nou beskikbaar is, kan skrywer nie hiermee saamstem nie en hoewel die ioniese meganisme soms wel die korrekte is, behoort die vry radikaalmeganisme tog onder homolitiese kondisies gevolg te word.

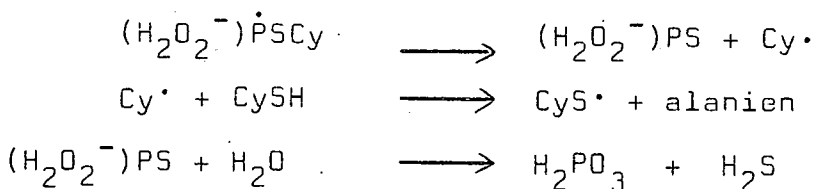
(ii) Vry radikaalmeganisme:

Na bewering^{315,369} reageer disulfiede en trialkielfosfiete onder homolitiese kondisies volgens 'n vry radikaalmeganisme. Hierdie meganisme geniet tans heelwat steun, en veral die werk van Walling³⁶⁷ versterk die vermoede dat hierdie meganisme die korrekte moet wees. Hy het die reaksie tussen triëtielfosfiet en dibutiël-disulfied ondersoek en gevind dat dit geïnduseer word deur radikaalopwekkers.

Na 'n intensiewe studie het Swanepoel³⁴⁸ tot die gevolgtrekking gekom dat die splitsing van disulfiede deur hipofosfiëtione in die teenwoordigheid van ultravioletlig ook volgens 'n radikaalmeganisme moet verloop. Dit is bekend dat tiëlradikale gevorm word wanneer disulfiede met ultravioletlig bestraal word en dit is dan ook die eerste stap in die splitsingsmeganisme. Die volgende stap is 'n reaksie tussen die tiëlradikaal en die enol-toutomeer van die hipofosfiëtioon, waardeur 'n neutrale kwadrikovalente fosforanielradikaal gevorm word, wat met 'n verdere disulfied kan reageer om 'n dubbelsout te vorm onder vrystelling van 'n tiëlradikaal. Die dubbelsout ontbind in water en vorm fosfiëtione en 'n tiol. Die volgende reaksieskema weerspieël hierdie reeks prosesse:-



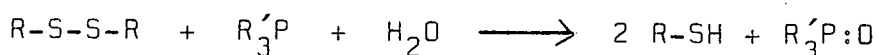
Wanneer meeste van die sistien gereduseer is, kan die fosforanielradikaal nie meer na die dubbelsout omgesit word nie en ontbind dit as volg:-



Bevestiging hiervan is verkry deur sistieën in die teenwoordigheid van hipofosfiëtione te bestraal. In hierdie geval word slegs die fosforanielradikaal en alanien gevorm, maar geen dubbelsout nie.

Die reduksie van disulfiede deur fosforbevattende reagente het wye velde geopen in die gebied van organiese en biochemie en daar bestaan baie moontlikhede vir industriële toepassings. Wolfram¹⁷⁸ het onlangs daarin geslaag om al die disulfiedbindings in wol met tris-(hidroksiometiel)fosfien, $P(CH_2OH)_3$, te reduseer. Daar is ook aangevoer dat hipofosforigsuur die setting van wol kan beïnvloed^{352,382,389}.

In een van die interessantste reaksies wat tans aangewend word vir die kwantitatiewe reduksie van disulfiede, word gebruik gemaak van tributiel- of trifenielfosfien:-



'n Reeks aromatiese disulfiede is op hierdie manier deur trifenielfosfien in waterige metanol na die ooreenkomstige tiolere gereduseer¹⁷³. Die reduksie verloop vinnig en kwantitatief by kamertemperatuur. Voorheen is beweer^{314,315} dat geen reduksie met trifenielfosfien verkry is nie. Al hierdie reaksies is egter in watervrye media uitgevoer, en uit die werk van Humphrey¹⁷³ het dit duidelik geword dat water nodig is in die reaksiemengsel, waarskynlik om as bron van waterstofatome te dien. Tributiel- en difenielfosfien is nog 'n beter reduseermiddel as trifenielfosfien, want dit is in staat om aromatiese (difenielfosfien- en dibensiel-) sowel as alifatiese (dibutiel- en dipropiel-) disulfiede kwantitatief te reduseer.

E K S P E R I M E N T E E L

EN

R E S U L T A T E

X. DIE SULFITOLISE VAN ' ONSIMMETRIESE DISULFIEDE(i) Die sintese van onsimmetriese disulfiede(a) Sintese van onsimmetriese disulfiede met lae molekulêre gewig:

Daar bestaan verskeie metodes waarvolgens onsimmetriese disulfiede berei kan word en aanvanklik is die metode wat deur Schöberl³⁰⁷ ontwikkel is, gebruik. In hierdie reaksie word die disulfied met perbensoësuur geoksideer om die tiolsulfinaat (R-S-SO-R) te gee, wat dan verder met 'n tiol reageer om die ooreenkomstige onsimmetriese disulfied te vorm. Ons kon egter nie daarin slaag om die onsimmetriese disulfied in 'n suiwer vorm te berei nie en gevolglik is afgesien van hierdie metode. Weens sy eenvoudigheid en die milde reaksiekondisies is tiol-disulfieduitruiling die sintesemetode wat algemeen aanbeveel word en dit is ook suksesvol in hierdie ondersoek gebruik.

Ekwimolêre hoeveelhede tiol en disulfied (ca. 5×10^{-3} M oplossing) is vir 30 minute by pH 7 (0.1 M trisbuffer) gehou en daarna aangesuur met asynsuur tot pH 2.5. In die gevalle waar sistien-³⁵S of sistamien-³⁵S gebruik is, is genoeg radioaktiewe reagens bygevoeg om 'n aktiwiteit van ongeveer 5 μ C/ml te gee.

Van die aangesuurde oplossing is 50 μ l geneem en die verskillende verbindings geskei deur middel van hoogspanningselektroforese in 10% asynsuur. 'n Spanningsgradiënt van 50 V/cm en stroomdigtheid van 0.7 mA/cm is deurgaans gehandhaaf op 'n strook papier van 100 x 15 cm wat by 0°C gehou is. Na die ionoforetiese skeiding is die papier gedroog, in drie stroke gesny en die drie stroke met ninhidrien, jodoplatinaat- en sianied-nitroprussiedreagense* respektiewelik gespuit.

* Ninhidrienreagens:

5 gm Ninhidrien is opgelos in 'n mengsel van 930 ml n-butanol en 70 ml asynsuur. Aminosure gee 'n blou kleur met hierdie reagens.

Jodoplatinaatreagens³⁶²:

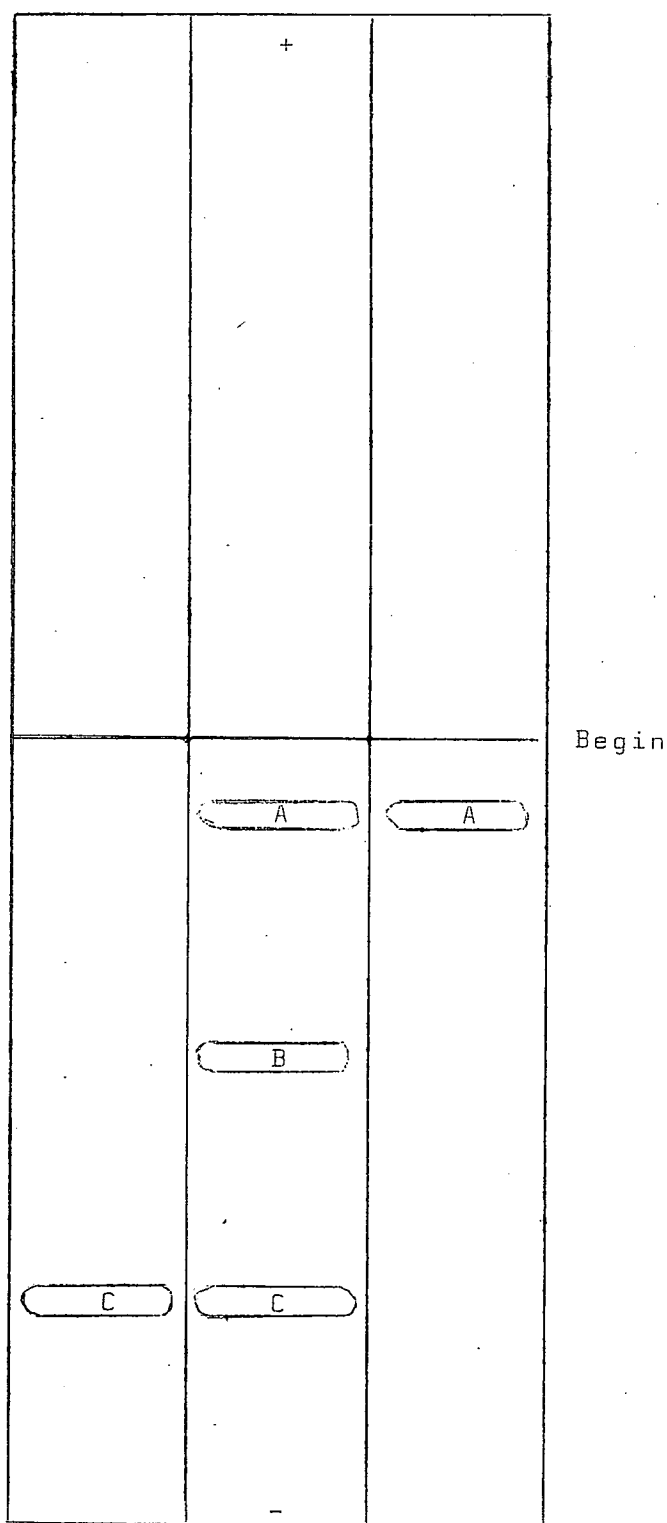
Gelyke volumes 0.17% PtCl₄⁻ en 10% KI-oplossing is gemeng net voor die ferogram gespuit is. Tirole, disulfiede en ander oksideerbare swaelverbindings gee 'n wit kol op 'n ligroos agtergrond met hierdie reagens.

Sianied-nitroprussiedreagens:

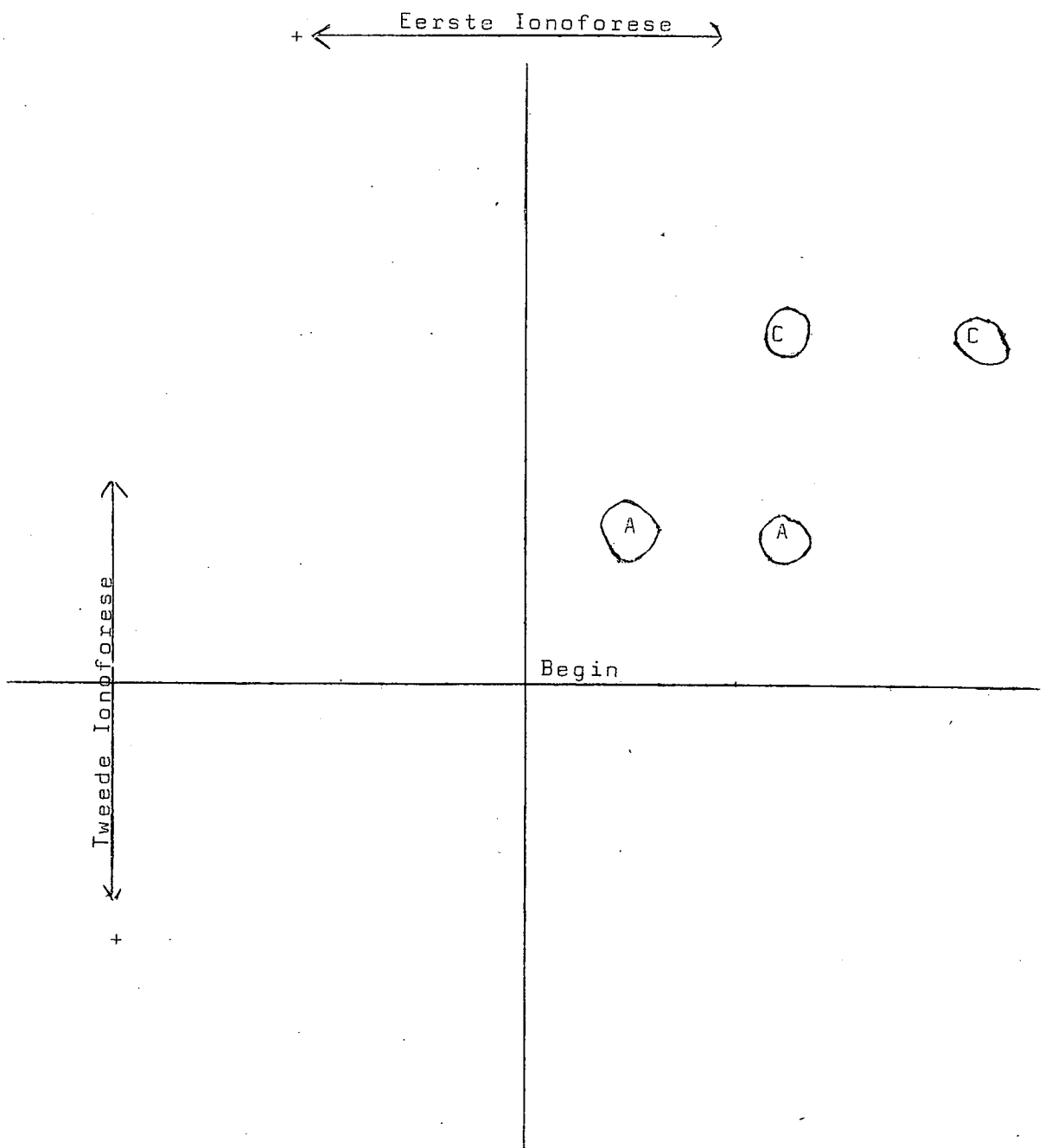
1% Natriumnitroprussied in 'n oplossing van 5% Na_2CO_3 en 5% NaCN . Tiolê en disulfiede gee 'n pers kleur op 'n liggeel agtergrond. Hierdie kleur is onstabiel en is net vir enkele minute waarneembaar.

Figuur I toon 'n tipiese skeiding wat met behulp van die hoogspanningselektroforese gevind is. In feitlik al die gevalle wat ondersoek is, is gevind dat daar drie verskillende verbindings in die reaksiemengsel teenwoordig is. Die ionoforetiese mobiliteite van verbindings A en C stem ooreen met dié van die twee uitgangstowwe nl. die tiol (R-SH) en die disulfied (R-S-S-R). Verbinding B lê ongeveer halfpad tussen A en C op die ferogram, wat impliseer dat dit die ooreenkomstige onsimmetriese disulfied (R-S-S-R) is. Dit is dan ook as volg bevestig: na die skeiding in die eerste rigting is die papier gedroog, gespuit met 'n oplossing van 0.5% merkptoëtanol in water, gedroog, natgespuit met 10% asynsuur en ionoforese uitgevoer in 'n rigting loodreg tot die eerste rigting. Daarna is die papier gedroog en met ninhidrien gespuit. Die resultaat word in figuur II getoon, waaruit blyk dat die reduksie van verbinding B deur merkptoëtanol lei tot die vorming van verbindings A en C. Verbinding B moet dus die onsimmetriese disulfied (RSSR) wees. Die enigste geval waar daar vier verskillende verbindings na ionoforese voorkom, is wanneer sisteamien of sistamien as uitgangstof gebruik word. Met behulp van merkers is bewys dat sisteamien en sistamien effens verskil in hul elektroforetiese mobiliteite en dat die ekstra band hieraan te wyte is. By al die ander sisteme is gevind dat die tiol en die ooreenkomstige disulfied identiese mobiliteite besit en gevolglik word na ionoforese net drie bande gevind wat toegeskryf word aan: RSH/RSSR , RSSR en RSH/RSSR .

Nadat die teenwoordigheid van die onsimmetriese disulfied in die reaksiemengsel aangedui is, is vervolgens oorgegaan tot die isolasie daarvan. Dit is moontlik om die onsimmetriese disulfied te skei van die ander verbindings met behulp van ioonuitruilingschromatografie. Crawhall⁷⁴ het bv. die disulfied penisillamien-sisteïen geïsoleer na skeiding op Amberlite 120 ioonuitruilhars. Skrywer het egter gevind dat skeiding met behulp van kontinueerlike papier-elektroforese 'n uiters geskikte en gerieflike metode is en



Figuur I. Hoogspanningsferogram van h mengsel van h tiol (A) en disulfied (C). Die buitenste bande bevat merkers van die tiol en die disulfied.



Figuur II. Tweedimensionele ionoferogram van 'n oplossing van 'n tiol en disulfied. Na die eerste skeiding is die ferogram gedroog en met 0.5% merkaptöëtanol gespuit. Ionoforese in 10% asynsuur by 15 volt/cm en 0.5 mA/cm vir 3 uur in beide rigtings.

dit is deurgaans gebruik vir die isolasies. Die reaksie-mengsel is geskei op 'n „Beckman Continuous Flow Paper Electrophoresis Cell, Model CP" met 2% asynsuur as medium. Die papiergordyn is afgekoel tot 0°C en 'n spanningsgradiënt van 7 V/cm en stroomdigtheid van 0.5 mA/cm in die geval van sisteamien-bevattende disulfiede, of 'n spanningsgradiënt van 27 V/cm en stroomdigtheid van 1.5 mA/cm in die geval van sisteëen-bevattende disulfiede, is deurgaans gehandhaaf. Deelvolumes van die fraksies wat opgevang is, is met waterige ninhidrien* behandel om die posisies van die verskillende verbindings te bepaal, waarna die fraksie wat die onsimmetriese disulfied bevat, by 0°C bewaar is.

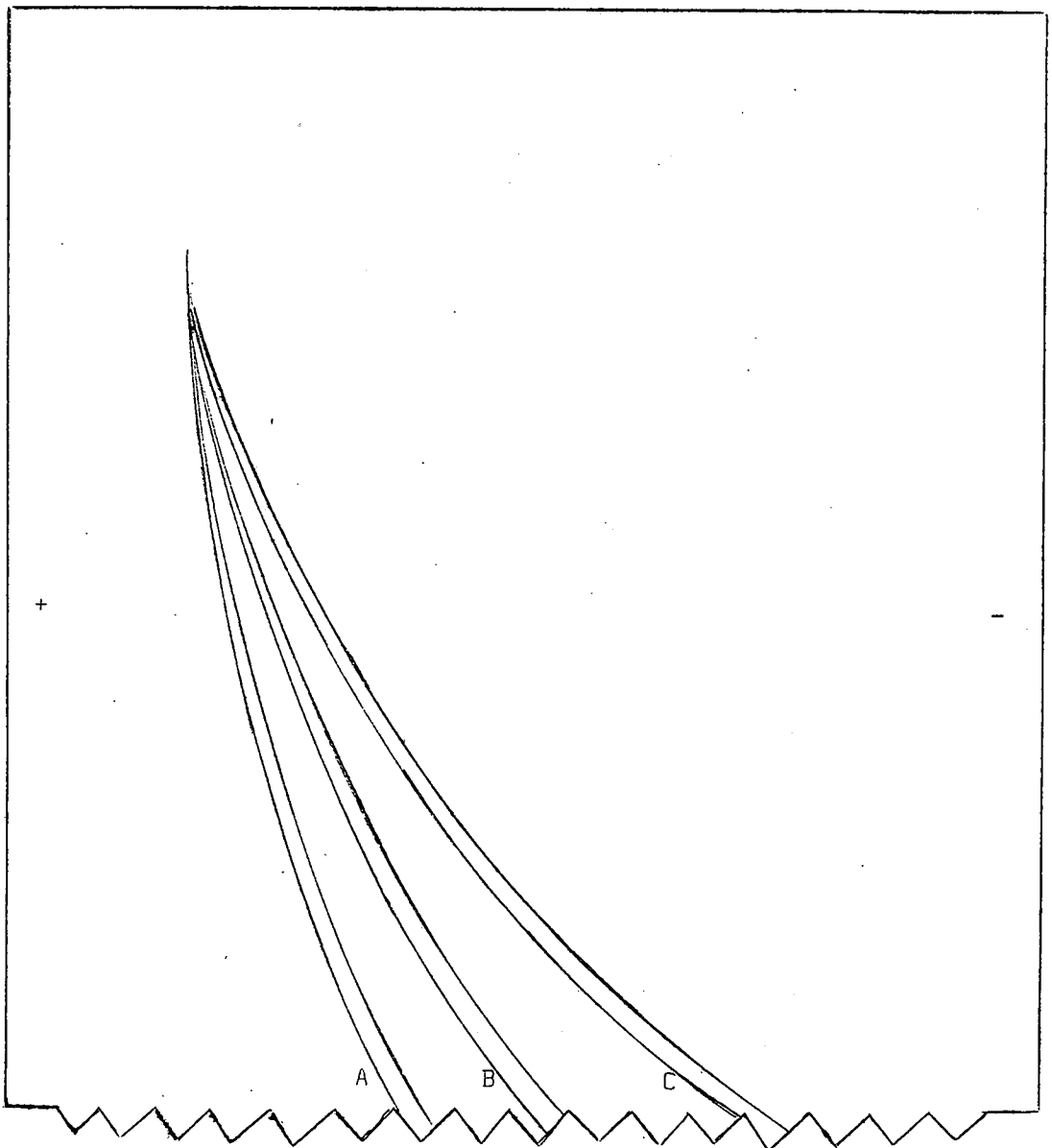
Wanneer die hele papiergordyn van die elektroforese-sel gedroog en met ninhidrien (in n-butanol) gespuit is, kan die pad wat elke spesie volg, duidelik gesien word. 'n Tipiese skeiding word in figuur III aangetoon.

Die volgende onsimmetriese disulfiede is op bogenoemde wyse berei:

sisteëen-sisteamien, homosisteëen-sisteamien, glutatioon-sisteamien, penisillamien-sisteamien, α -metielsisteëen-sisteamien, tioglikolsuur-sisteamien, merkptoëtanol-sisteamien, β -merkaptopropioonsuur-sisteamien, α -merkaptopropioonsuur-sisteamien, isopropielmerkaptaan-sisteamien, N-asetielsisteëen-sisteamien, tioglikolsuur-sisteëen, α -merkaptopropioonsuur-sisteëen, β -merkaptopropioonsuur-sisteëen, en etielmerkaptaan-sisteëen.

In die geval waar 3-karboksi-4-nitrotiofenol (CNT) deel van die onsimmetriese disulfied vorm, was bogenoemde skeidingsmetode onbevredigend omdat hierdie aromatiese verbindings in 'n mate deur die papier geadsorbeer word. Dit is gevind dat 'n beter skeidingsmetode vir sulke gevalle adsorpsiechromatografie op 'n dekstrankolom is ^{118,278-280}. Sephadex G-10 is vir 60 minute in 10%

* Die ninhidrienbepalingsmetode (sitraatbuffer + metielsellosolf) van Moore en Stein ²⁵⁸ is gebruik.

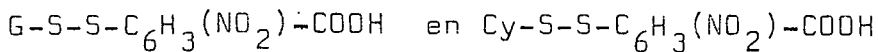


Figuur III. Kontinueerlike elektroferogram van
 n tiol-disulfiedoplossing.

- A = RSH
- B = RSSR'
- C = RSSR'

asynsuur geweek en daarna is 'n kolom met deursnit 2 cm en lengte 50 cm hiermee gepak. Fraksies van die reaksiemengsel (10 ml) is op die kolom geplaas en met 10% asynsuur geëluëer. Die uitlaat van die kolom het deur 'n ultravioletmonitor (L.K.B. Uvicord) wat aan 'n registreerder verbind is, gegaan, en vervolgens na 'n fraksieversamelaar waar 5 ml fraksies opgevang is. Monsters van elke fraksie is ook met waterige ninhidrien behandel en die ninhidrienchromatogram saam met die ultravioletaftasting gee 'n duidelike beeld van die skeiding wat verkry is. 'n Tipiese skeiding word in figuur IV aangetoon. Die vier geskeide verbindings is spektrofotometries en met behulp van hoogspannings-elektroforese geïdentifiseer en die fraksie wat die onsimmetriese disulfied bevat, is by 0°C bewaar.

Die volgende onsimmetriese disulfiede is op bogenoemde manier berei:-



waar G die tripeptied γ -glutamiel-alaniel-glisien en Cy $HOOC-CH(NH_2)-CH_2-$ is.

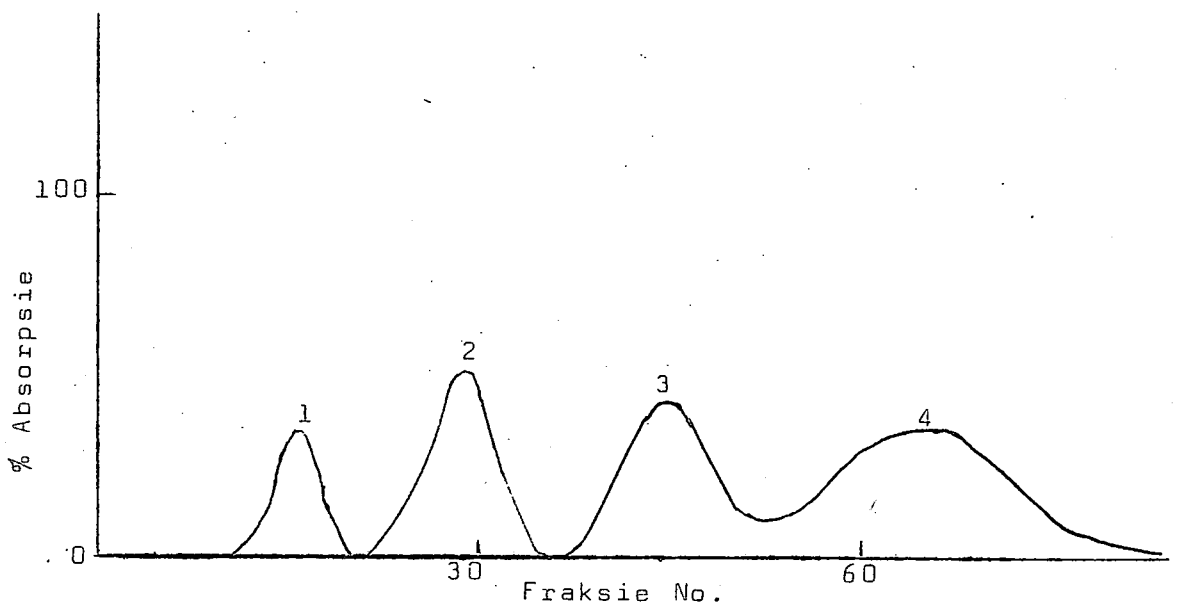
(b) Die sintese van onsimmetriese proteïen-S-S-Cy disulfiede:

Die metode wat hier gebruik is, is deur Eldjarn⁹⁶ ontwikkel:-

By 10 ml van 'n oplossing van 1% proteïen in 0.1 M trisbuffer (pH 7.2) is 25 μ l 0.1 M sisteïen-³⁵S-oplossing (aktiwiteit 0.50 μ C/ μ l) gevoeg en die oplossing vir 60 minute by kamertemperatuur geroer, waarna die reaksiemengsel vir 24 uur teen kraanwater in Visking No.23 dialisebuis gedialiseer is. Vervolgens is die oplossing gevriesdroog en die droë produk by 0°C bewaar. Net voordat dit gebruik is, is die proteïen opgelos in 5 ml trisbuffer (pH 7.2). Onsimmetriese disulfiede van sisteïen met die volgende proteïene is volgens hierdie metode berei:

beesplasma-albumien, urease, hemoglobien en laktalbumien.

Ten einde seker te maak dat al die sisteïen-³⁵S wat nie deur dialise verwyder is nie, wel chemies aan die proteïen gebind is, is 'n fraksie van die proteïen opgelos



Figuur IV. Die skeiding van CNT-bevattende
onsimmetriese disulfiede op
Sephadex-G10.

1 = Glutatioon

2 = G-S-S-C₆H₃(NO₂)-COOH

3 = DTN

4 = CNT

in trisbuffer (pH 7.2) en vir 90 minute onderwerp aan hoogspanningselektroforese. (Stroomdigtheid 0.7 mA/cm en spanningsgradiënt 50 V/cm). Hierna is die papier gedroog en deur 'n radiochromatogramafleeser gevoer. In al die gevalle was al die radioaktiwiteit teenwoordig op die posisie waar die oplossing gelaai is (proteïene beweeg nie onder bogenoemde elektroforetiese toestande nie) en geen radioaktiwiteit is gevind teenoor die posisie van sisteïen-³⁵S-merkers nie. In 'n verdere eksperiment is merkaptotoëtanol by 'n deelvolum van bogenoemde proteïenoplossing gevoeg (om 'n 1% merkaptotoëtanoloplossing te gee), die reaksiemengsel is vir 1 uur geroer en daarna spoos voorheen gedialiseer en gevriesdroog. 'n Onderzoek van die gevriesdroogde proteïen het aangetoon dat dit geen radioaktiewe reagens bevat nie. Dus kan met veiligheid aanvaar word dat die sisteïen-³⁵S deur middel van 'n disulfiedbinding aan die proteïen gebind is.

(ii) Die sulfitolise van onsimmetriese disulfiede:

Die reaksie van sulfietione met onsimmetriese disulfiede:

'n Deelvolum (5 ml) van die oplossing van die onsimmetriese disulfied in 2% asynsuur is tot pH 5, 7 of 9.5 gebring deur die byvoeging van 2 M NaOH, tris-(hidroksiometiel)aminmetaan of Na_3PO_4 respektiewelik, waarna die oplossing opgemaak is tot 10 ml met water. In die geval van die onsimmetriese disulfiede tussen proteïene en sisteïen is die gevriesdroogde proteïen opgelos in 5 ml trisbuffer (1 M, pH 7.2). Waar die invloed van denaturering op die spesifisiteit van die aanval bestudeer is, is ureum by die oplossing gevoeg om 'n finale konsentrasie van 8 M te gee.

Vervolgens is 'n oplossing van natriumsulfiet (0.4 M) en CH_3HgI^* (0.013 M) in die ooreenkomstige buffer gemaak en 1 ml hiervan by die oplossing van die onsimmetriese disulfied gevoeg. (Vars sulfietoplossing is elke dag berei). Die mengsel is vir 20 minute by kamertemperatuur geroer en dan aangesuur tot pH 2.5 deur die byvoeging van asynsuur. In enkele gevalle is die CH_3HgI vervang deur 'n oplossing van 0.1 M N-etielmaleïenimid.

* CH_3HgI is berei volgens die metode van Leach²¹⁴.

Ondersoek na die snelheid van die reaksie van CH_3HgI met verskillende tiol:

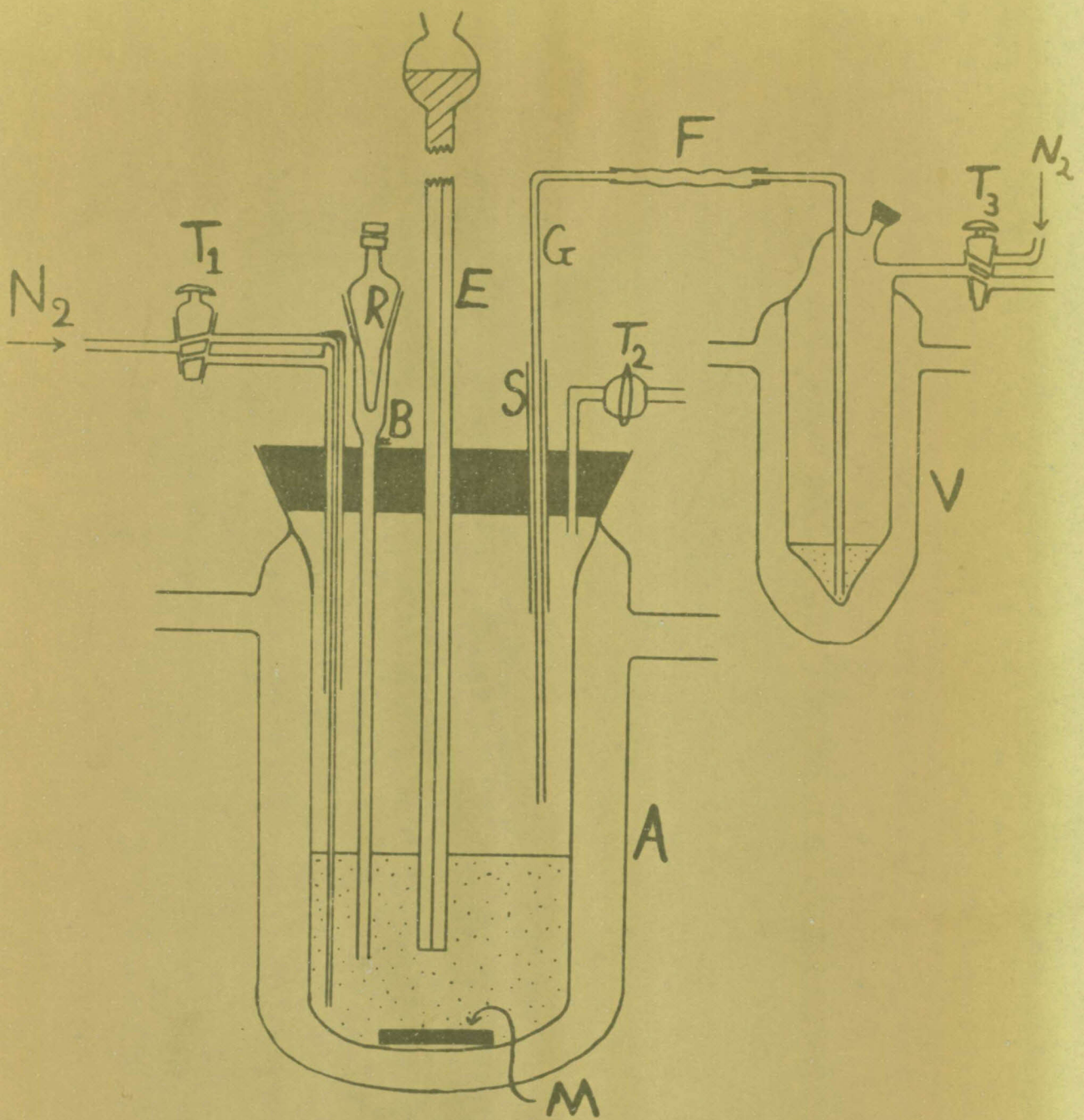
Die ondubbelsinnige vertolking van die resultate vereis dat CH_3HgI baie vinnig met die tiol wat deur die sulfitolise van die disulfied gevorm word, moet reageer ten einde sekondêre reaksies soos oksidasie te verhoed. Hierdie reaksie is as volg ondersoek:

'n Oplossing van CH_3HgI (0.001 M) in trisbuffer (pH 9.3, 0.1 M) wat KCl (0.1 M) bevat, is opgemaak en monsters van die verskillende tiol (0.01 M) wat bestudeer is, is opgelos in trisbuffer (pH 7.0).

Die ondersoek is met behulp van 'n registrerende polarograaf (Metrohm Polarecord E261) met 'n vibrerende, druppende kwikelektrode met konstante $M^{2/3} t^{-1/2} = 2.68 \text{ mg}^{2/3} \text{ sek}^{-1/2}$, uitgevoer (E in figuur V). 'n Geforseerde drup-frekwens van 6 druppels per sekonde is deurgaans gehandhaaf. Die galvanometer-sensitiwiteit was 10^{-8} A/mm met demping 2 en kompensasiestroominstelling 4. 'n Ag/AgCl-verwysings-elektrode, R, het terselfdertyd ook as nie-polariserende elektrode gedien en is met die vloeistof verbind deur 'n versadigde KCl-1%-agarbrug.

Dit is bekend²¹⁴ dat die halfgolfpotensiaal van CH_3HgI by pH 9.3 ongeveer -0.6 V is vs. die Ag/AgCl-elektrode. Die druppende elektrode is by 'n konstante potensiaal van -0.8 V (vs. die Ag/AgCl-elektrode) gehou en die reaksie van die CH_3HgI met die tiol is gevolg deur die registrasie van die grensstroom as 'n funksie van tyd. Die halfgolfpotensiaal van die gevormde metielmerkurimerkaptied R-S-HgCH₃ lê by -1.1 V (vs. Ag/AgCl-elektrode) en meng dus nie hier in nie²¹⁴.

20 ml CH_3HgI -oplossing is in mantelsel A by 2^oC geplaas en 1 ml tioloplossing in houër V. (V is ook afgekoel tot 2^oC). Om suurstof uit die sisteem te verwyder, is kraan T₂ gesluit en stikstofgas by kraan T₁ ingelaat, deur die oplossing in A geborrel, dan deur die glasbuis G (wat bokant die vloeistofoppervlakte hang), en deur die afleibuis F deur die vloeistof in houër V gevoer en dan uit by kraan T₃. Nadat vir 20 minute ontgas is, is die polarograaf en registreerder aangeskakel, T₁ gesluit en T₂ geopen. Afleibuis G is tot in die vloeistof in A laat sak en die roerder M is aangeskakel. Daarna is kraan T₃



Figuur V. Sel waarin die reaksie tussen CH_3HgI en tiole ondersoek is.

omgeskakel en stikstof in die teenoorgestelde rigting deurgestuur. Dit verplaas die tioloplossing tot in A, waar die mengsel vir n verdere 2 sekondes heftig geroer is voordat roerder M vinnig met behulp van 'n direkte-stroom rem gestop is. Voltooiing van die reaksie is aangetoon deur 'n konstante grensstroom.

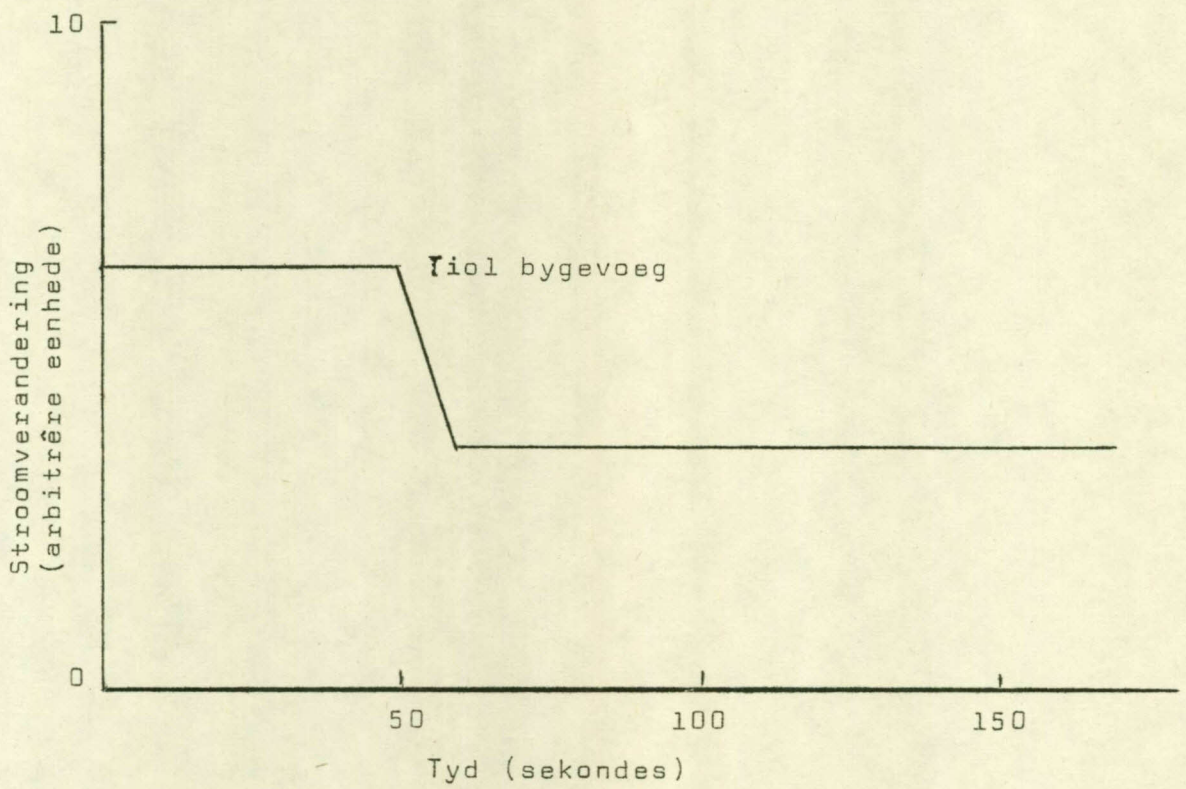
'n Tipiese kurwe van die stroomverandering teen reaksietyd word in figuur VI aangetoon. Die reaksiesnelheid van CH_3HgI met verskeie* tiole is ondersoek en in al hierdie gevalle is die reaksie binne 8 sekondes voltooi by 2°C . Die reaksie mag nog baie vinniger plaasvind, maar dit was nie eksperimenteel moontlik om die proses in vinniger as ongeveer 8 sekondes uit te voer nie. Aangesien die sulfitoliese van die disulfiede in die teenwoordigheid van CH_3HgI by kamertemperatuur ($15-20^\circ\text{C}$) gedoen is en dit bekend is dat reaksiesnelhede toeneem met temperatuurverhogings, kan aanvaar word dat die reaksie tussen die gevormde tiol- en CH_3HgI vinnig genoeg plaasvind vir die doeleindes van hierdie ondersoek.

Die spesifisiteit van CH_3HgI as tiolreagens:

Dit word normaalweg aanvaar dat CH_3HgI 'n spesifieke reagens vir tiol- is en dat dit nie disulfied-bindings aanval nie. Hierin lê dan ook sy groot voordeel as analitiese reagens opgesluit en dit word bv. algemeen gebruik om die tiol- of tiol- plus disulfiedinhoud (in teenwoordigheid van sulfietione) van proteïene te bepaal^{214,215}.

Uit die resultate wat verkry is, het in een geval twyfel ontstaan oor die algemene geldigheid van bogenoemde aanname. Dit is die geval waar die onsimmetriese disulfied sisteamien-sisteïene met sulfietione reageer in die teenwoordigheid van CH_3HgI . Hoewel nie een van die ander onsimmetriese disulfiede pH-afhanklike resultate gegee het nie, het die resultate verkry van sisteamien-sisteïene begin afwyk van die normale patroon sodra die pH van die reaksie-medium bokant 8 verhoog is. (Tabel II). Daar is twee moontlike verklarings hiervoor: dié onsimmetriese disulfied is onstabiel in alkaliese medium, óf dit word

* Sisteamien, tioglikolsuur, α -merkaptopropioonsuur, β -merkaptopropioonsuur, glutatien, sisteïene en N-asetielsisteïene.



Figuur VI. Die reaksie van CH_3HgI met 'n tiol, geregistreeer as 'n funksie van tyd.

ontbind deur die CH_3HgI by hoë pH-waardes. Daar is as volg te werk gegaan om vas te stel waardeur hierdie ontbinding veroorsaak word:-

Die onsimmetriese disulfied is vir 30 minute by pH 9.5 gehou in fosfaatbuffer in die afwesigheid van sulfiet en CH_3HgI . Daarna is die oplossing aangesuur en 'n fraksie op 'n hoogspanningsferogram geskei. Die onsimmetriese disulfied is onveranderd herwin, en dus word die ontbinding nie deur die alkaliniteit van die oplossing veroorsaak nie. Hierna is die disulfied met CH_3HgI behandel (in die afwesigheid van sulfiet) by pH 5, 8.2 of 9.5 vir 30 minute en daarna weer elektroforeties geskei. In die geval van pH 5 is die disulfied onveranderd herwin, maar by pH 8.2 en 9.5 is gevind dat die disulfied gedeeltelik ontbind het om, afgesien van sisteïen- ^{35}S , twee radioaktiewe verbindings te gee wat in elektroforetiese mobiliteite ooreenstem metalaniensulfiensuur en sisteïensuur.

As kontrole is die stabiliteit van al die onsimmetriese disulfiede in die teenwoordigheid van CH_3HgI en/of hoë pH (9.5) ondersoek, maar in geeneen van die ander gevalle is enige ontbinding in die afwesigheid van sulfietione ondervind nie. Die resultate soos aangegee in tabelle II en III kan dus beskou word as 'n direkte maatstaf van die voorkeur van sulfiet vir die swaelatome van die disulfied.

Die skeiding en kwantitatiewe bepaling van die reaksieprodukte van die gesulfitoliseerde disulfiede:

By die sulfitolise van 'n onsimmetriese disulfied in die teenwoordigheid van metielkwikjodied word daar, afgesien van die tweemetielmerkurimerkaptiede, ook die twee ooreenkomstige tiolsulfonate RSSO_3^- en $\text{R}'\text{SSO}_3^-$ gevorm. Die plan was aanvanklik om laasgenoemde twee derivate te skei en kwantitatief te bepaal, waarna vasgestel sou kon word of die sulfietione enige voorkeure toon vir die twee swaelatome van die onsimmetriese disulfied. Volgens die werk van de Marco⁸² is dit moontlik om verskillende R-S-SO_3^- -derivate van mekaar te skei deur chromatografie op ioonuitruilharse. Skrywer het gevind dat die tiolsulfonate gevorm vanaf die onsimmetriese disulfiede sisteïen-sisteamien, homosisteïen-sisteamien en glutatioon-sisteamien kwantitatief geskei kan word op 'n Beckman Spinco aminosuuranaliseerder. Die eksperimentele kondisies verskil van die wat deur

de Marco gebruik is en is deur Mellet²⁴⁹ van hierdie laboratorium ontwikkel. Die elueringsbuffer wat gebruik is, is as volg opgemaak:

396.1 gm $\text{Na}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 gm^l BRIJ-35 benattingsmiddel en 2 ml kaprielsuur is opgemaak na 20 liter met gedistilleerde water. Die pH (2.98) is ingestel met HCl.

Vir die kwantitatiewe bepaling van die hoeveelhede R-S-SO_3^- gevorm, moet die kolorimetriese kleurkonstantes³³³ van hierdie verbindings bepaal word. Hiermee is heelwat probleme ondervind. So bv. is 'n aantal R-S-SO_3^- -derivate berei volgens die metode van de Marco en medewerkers^{69,84} en hul kleurkonstantes bepaal. Die waardes wat verkry is, word in tabel I aangegee.

TABEL I

Verbinding	Kolorimetriese kleurkonstante
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-S-SO}_3\text{Na}$	14.34
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-SO}_3\text{Na}$	12.00
$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-SO}_3\text{Na}$	14.05

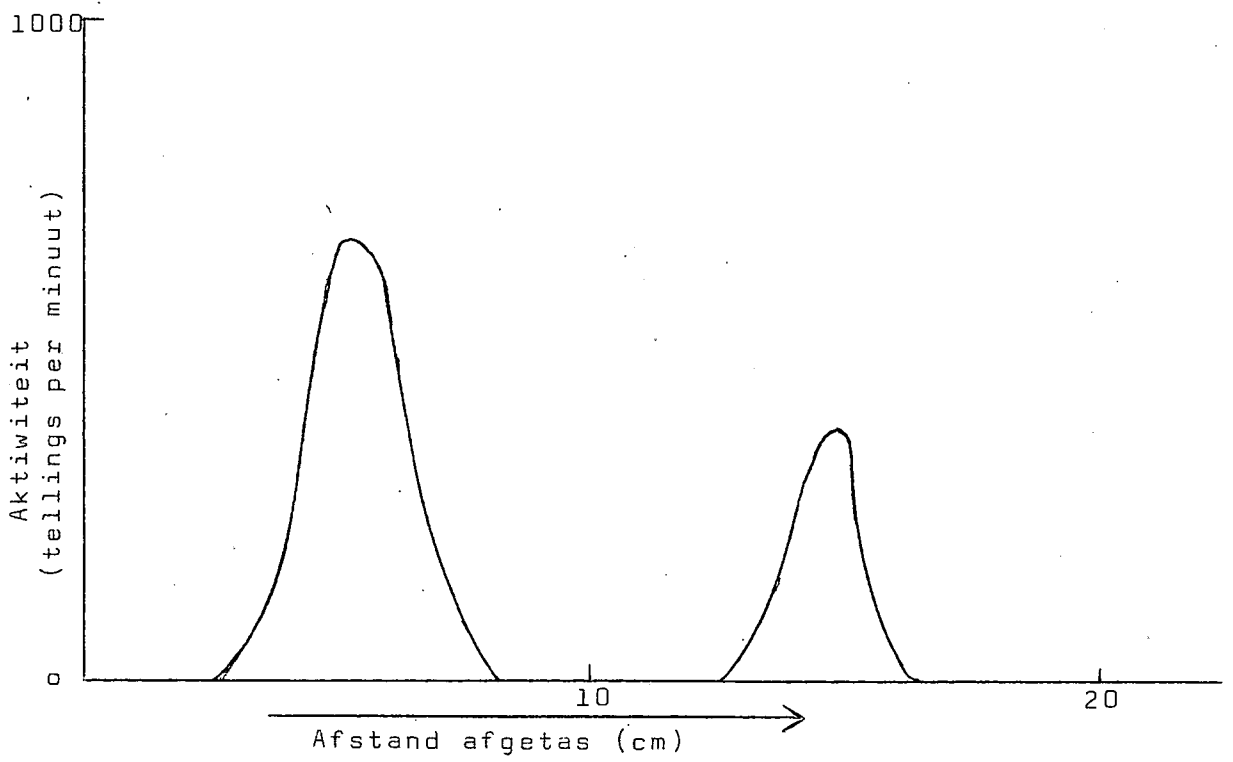
Hierdie resultate is aanvanklik as korrek aanvaar, maar later het dit duidelik geword dat die bereidingsmetode van de Marco nie 'n analities suiwer produk gee nie en dat bogenoemde kleurkonstantes gevolglik nie betroubaar is nie. In 'n onlangse publikasie¹⁵⁰ het de Marco dan ook erken dat hulle produk gekontamineer was met onsuiverhede. Afgesien van bogenoemde moeilikhede was dit verder ook nie moontlik om tiolsulfonaatderivate wat geen aminogroepe bevat, met die ninhidrienmetode te bepaal nie en sou allerlei indirekte bepalingsmetodes gevolg moes word.

Bogenoemde bepalingsmetode bring dus heelwat probleme mee en gevolglik is daarvan afgesien en oorgeskakel na die gebruik van radioaktiewe reagentse in die vorm van ³⁵S-gemerkte sisteamien en sisteïen. Al die probleme wat hierbo ondervind is, word hiermee uitgeskakel want die ³⁵S-gemerkte reagens het die voordeel dat dit in besonder lae konsentrasies bepaalbaar is en self as standaard dien.

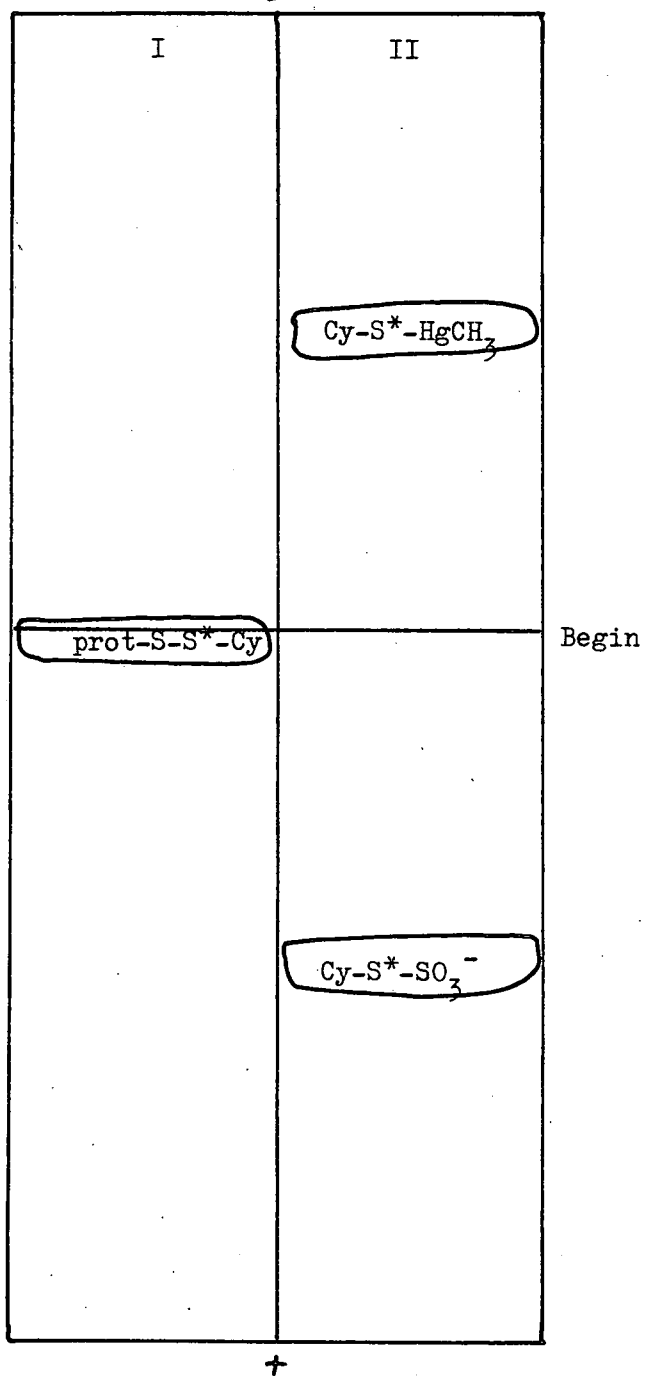
Verder is die skeiding en bepaling van die reaksieprodukte redelik eenvoudig. Die instrument wat gebruik is om die aktiwiteite te meet, is 'n "Packard Model 7200 Radiochromatogram Scanner". Die radioaktiwiteit is gemeet deur middel van twee vensterlose gasvloeï Geiger-telbuis, afgeskerm deur loodskerms met kollimators wat in 'n 4 T rangskikking geplaas is om beide kante van die papier te monitor. Kontaminasie van die telbuis word deur 'n stroom inerte gas verhoed. Die ferogrampapier word outomaties deur die apparaat gevoer teen 'n snelheid wat gesinchroniseer is met dié van die motor wat die papier deur die registreerder voer. Gevolglik kan die posisies van die aktiewe verbindings maklik gelokaliseer word en met die hulp van merkers geïdentifiseer word.

Die volgende prosedure is in al die gevalle gebruik:- Deelvolumes (50 μ l) van die reaksiemengsel is aan hoogspannings-elektroforese onderwerp by 'n spanningsgradiënt van 50 V/cm en stroomdigtheid van 0.7 mA/cm, op 'n strook papier van 100 x 15 cm wat in 10% asynsuur geweek en by 0°C gehou is deur afkoeling. Merkers van $R-S^*-SO_3^-$, $R-S^*-HgCH_3$ en die onsimmetriese disulfied (R-S-S-R) is ook op die papier geplaas. Die duur van die elektroforese het gewissel tussen 60 en 100 minute, afhangende van die disulfied wat bestudeer is. Na elektroforese is die papier gedroog, die stroke wat die verskillende verbindings bevat, uitgesny en die konsentrasies van die produkte bepaal deur aftasting van die ferogramme en integrasie van die pieke. 'n Tipiese skeiding word in figuur VII aangetoon. As kontrole is 'n verdere 50 μ l van die reaksiemengsel op 'n strook droë papier gelaai en die konsentrasie soos hierbo bepaal. In al die gevalle het die aktiwiteite ooreengestem. Onder die reaksiekondisies wat gebruik is, is gevind dat al die onsimmetriese disulfiede binne 20 minute kwantitatief deur sulfietione gesplits is en dat die ferogramme slegs die twee gemerkte verbindings $R-S^*-SO_3^-$ en $R-S^*-HgCH_3$ bevat het.

In die bespreking sal aangetoon word dat $RSSO_3^-/R'SSO_3^- = RSSO_3^-/RSHgCH_3$, sodat die affiniteit van die sulfietione vir die swaelatome van die onsimmetriese disulfied direk uit die verhouding van die twee radioaktiewe produkte bepaal kon word. In ons ondersoek is die affiniteit van sulfiet vir die swaelatome van verskeie onsimmetriese disulfiede bepaal en die resultate word in tabelle II en III aangegee.



Figuur VII. Radioferogram van h gesulfitoliseerde ^{35}S -bevattende onsymmetrische disulfied.



Figuur VIII. Hoogspanningsferogram van proteïen-S-S*-Cy

I = Onbehandel

II = Behandel met sulfiet + CH₃HgI

TABEL II

Nr.	R-S-S-R [*]	RSSO ₃ ⁻ /R'SSO ₃ ⁻ vir reaksie by pH		
		5	7	9.5
I	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -COOH	0.97	1.02	0.96
II	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -OH	1.00	1.07	-
III	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂) COOH	0.95** 0.97	0.91 -	0.95 -
IV	H ₃ C-CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH	-	2.26	-
V	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(NH ₂)- COOH	2.08** 2.05	2.04 -	2.35*** -
VI	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(NH ₂)- COOH	-	1.90	1.95
VII	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(COOH)- NH-CO-CH ₃	2.00	2.09	-
VIII	HOOC-CH(NH) ₂ -(CH ₂) ₂ -CO-NH H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH-CO-NH- CH ₂ -COOH	1.86** 1.83	1.79 -	1.86 -
IX	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-	1.79	-
X	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -C(CH ₃)(NH ₂)-COOH	30.0	30.0	32.0
XI	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH(CH ₃)-COOH	20.0	24.0	-
XII	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-C(CH ₃) ₂ -CH(NH ₂) COOH	> 100	> 100	> 100
XIII	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -COOH	2.30	2.30	2.25
XIV	HOOC-CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH	1.67	1.60	-
XV	HOOC-CH(CH ₃)-S-S-CH ₂ -CH(NH ₂) COOH	0.28	0.35	-
XVI	HOOC-CH(NH ₂)-CH ₂ -S-S-C ₆ H ₃ (NO ₂)- COOH	-	> 100	-

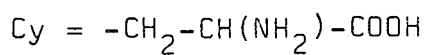
*R verwys na die groep aan die linkerkant van die disulfiedbinding en R' na die groep aan die regterkant daarvan.

**Waardes verkry wanneer N-etiëlmaleïenimied i.p.v. CH_3HgI gebruik word om die gevormde tiale te blokkeer.

***Die verhouding verkry by pH 8.2 is 2.18.

TABEL III

Onsimmetriese disulfied	Cy-S-SO ₃ ⁻ /Prot.S-SO ₃ ⁻	
	pH 7.2	pH 7.2, 8 M ureum
Cy-S-S-albumien	9.0	1.0
Cy-S-S-urease	4.0	1.0
Cy-S-S-hemoglobien	2.0	1.0
Cy-S-S-laktalbumien	9.0	1.0



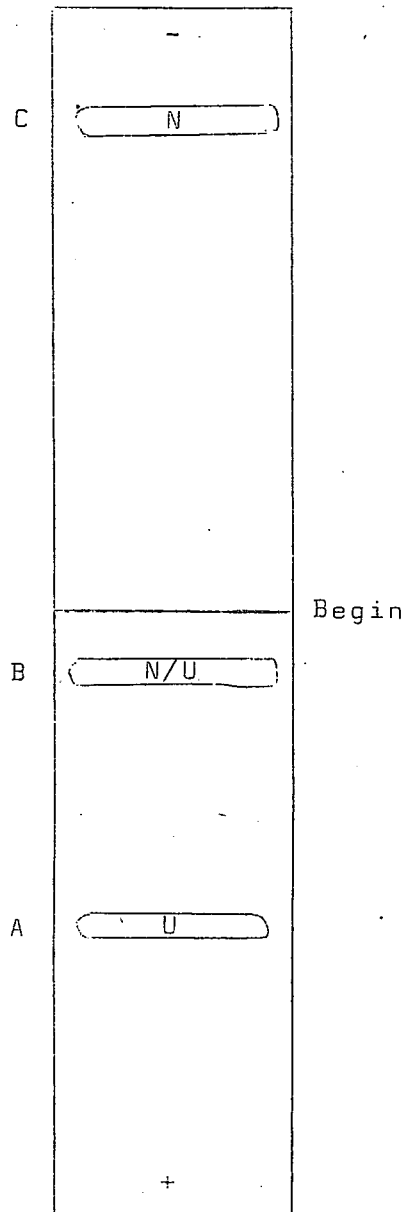
XI. TIOL-DISULFIEDUITRUILING EN DIE KWANTITATIEWE
BEPALING VAN TIOLE MET 5,5'-DITIOBIS-
(2-NITROBENSOËSUUR) (DTN)

(i). Die vorming en identifikasie van onsimmetriese
disulfiede in die reaksie tussen DTN en tiole:

Ekwimolêre hoeveelhede DTN en glutatioon (0.1 M) is opgelos in trisbuffer (0.1 M, pH 7.4), vir 30 minute by kamertemperatuur gehou en daarna aangesuur tot pH 2.5 met asynsuur. 'n Deelvolumen van die oplossing is onderwerp aan papierelektroforese met 10% asynsuur as medium. (Spanningsgradiënt 17 V/cm, stroomdigtheid 0.5 mA/cm). Na elektroforese is die papier gedroog en het 'n ondersoek in naby-ultravioletlig („swartlig“-lamp wat hoofsaaklik lig van golflengte 366 m μ uitgee) die teenwoordigheid van twee donker bande A en B getoon (figuur IX). Die ionoforetiese mobiliteit van band A stem ooreen met dié van 'n merker van DTN. (Soos in die geval van sisteïen en glutatioon, het die gereduseerde vorm van DTN, nl. 3-karboksi-4-nitrotiofenol (CNT) dieselfde elektroforetiese mobiliteit as die ooreenkomstige disulfied in 10% asynsuur). Verbinding A is uit die papier geloog met trisbuffer (0.1 M, pH 7.4) en die absorpsiespektrum daarvan is spektrofotometries* bepaal. Die spektrum toon absorpsiepieke by 340 en 412 m μ , wat die golflengtes is waar DTN en CNT onderskeidelik absorpsiemaksima het, sodat verbinding A waarskynlik uit 'n mengsel van DTN en CNT bestaan. Vir die skeiding van stof A in sy komponente, is gebruik gemaak van adsorpsiechromatografie op gekruis^{ge}bande dekstran soos op bladsy 60 beskryf is. Hiervolgens bestaan A uit twee verbindings wat in hul elueringsposisies met DTN en CNT onderskeidelik ooreenstem. Bepaling van die absorpsiespektra van die twee geskeide produkte het bevestig dat dit DTN en CNT is. Stof A bestaan dus uit 'n mengsel van bogenoemde twee verbindings.

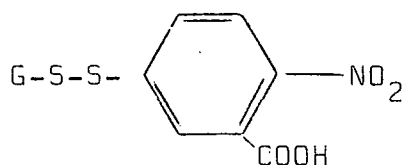
Wanneer die ferogram (hierbo genoem) met ninhidrien gespuit word, is gevind dat bande B en C ninhidrienpositief is (figuur IX). Band C kom ooreen met 'n glutatioonmerker in sy elektroforetiese gedrag. Op 'n Sephadex G-10 kolom word dit by dieselfde posisie as 'n glutatioonmerker geëlueer, wat bevestig dat verbinding C glutatioon is. Band B se elektroforetiese mobiliteit toon dat dit moontlik 'n reaksieprodukt

* In hierdie ondersoek is 'n Beckman DB- en Unicam SP 700-spektrofotometer gebruik.



Figuur IX. Hoogspanningsferogram
van h oplossing van
ekwimolêre hoeveelhede
DTN en glutatioon.

van A en C kan wees, want dit lê ongeveer halfpad tussen A en C op die ferogram. Die feit dat dit 'n ninhidrien-reaksie sowel as absorpsie van langgolflengte ultravioletlig toon, het hierdie vermoede verder versterk. Verbinding B is vervolgens ondersoek met behulp van reduksie- en tweedimensionele elektroforese. Na elektroforese in die eerste rigting is die papier gedroog, met 'n waterige oplossing van 1% merkaptoëtanol gespuit, gedroog en dan met 10% asynsuur gespuit waarna elektroforese uitgevoer is soos voorheen, maar in die komplementêre rigting. Daarna is die papier gedroog en die posisies van die verskillende verbindings soos voorheen vasgestel. Die ninhidrien-positiewe verbindings is N gemerk en dié wat ultravioletlig absorbeer U (figuur X). Dit is duidelik dat verbinding B deur die behandeling met merkaptoëtanol ontbind is om glutatioon en CNT te vorm. Aangesien dit bekend is dat merkaptoëtanol disulfiedbindings reduseer, kan aanvaar word dat verbinding B bestaan uit glutatioon en CNT wat deur 'n disulfiedbinding gebind is en as volg daar uitsien:

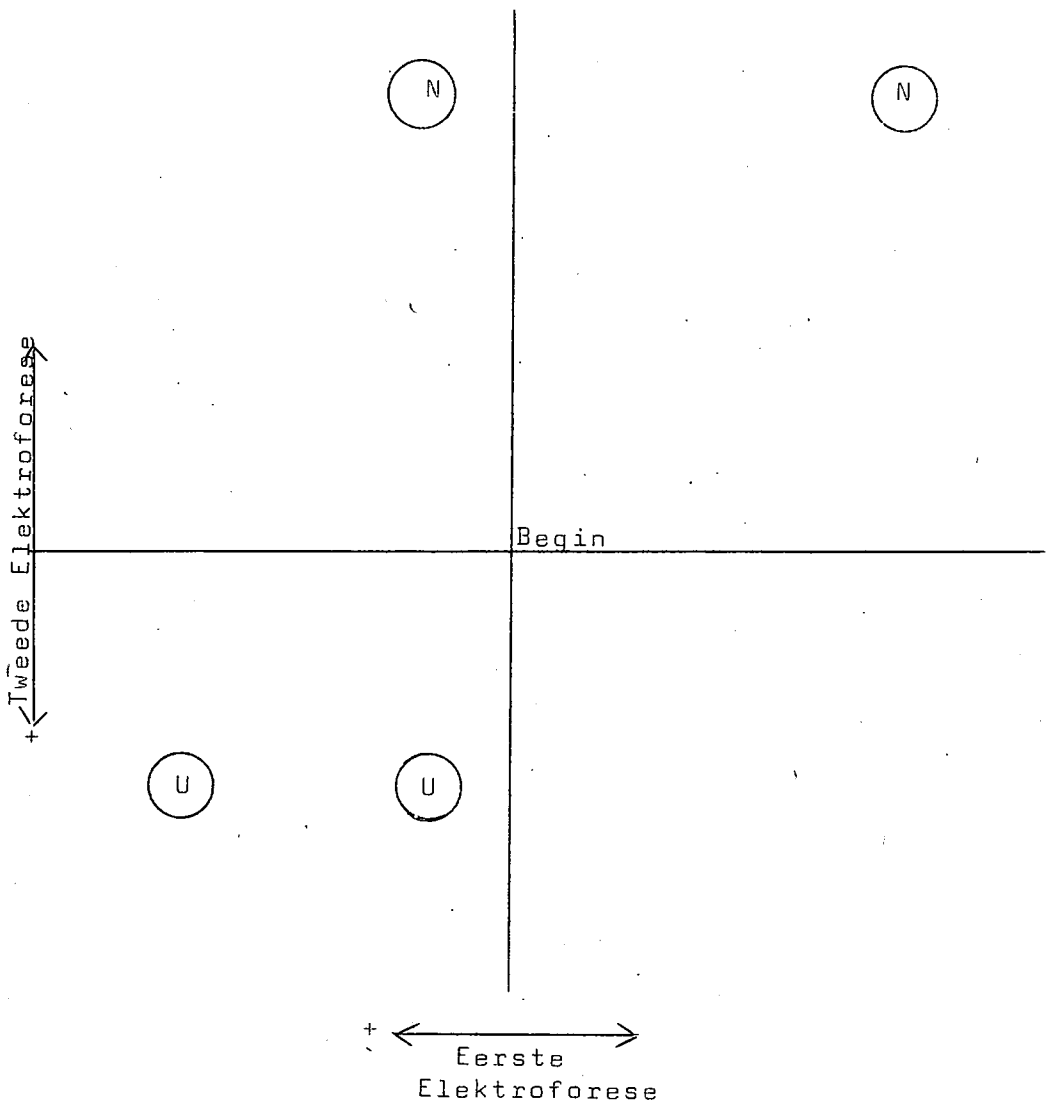


(G = γ -glutamiel-alaniel-glisien)

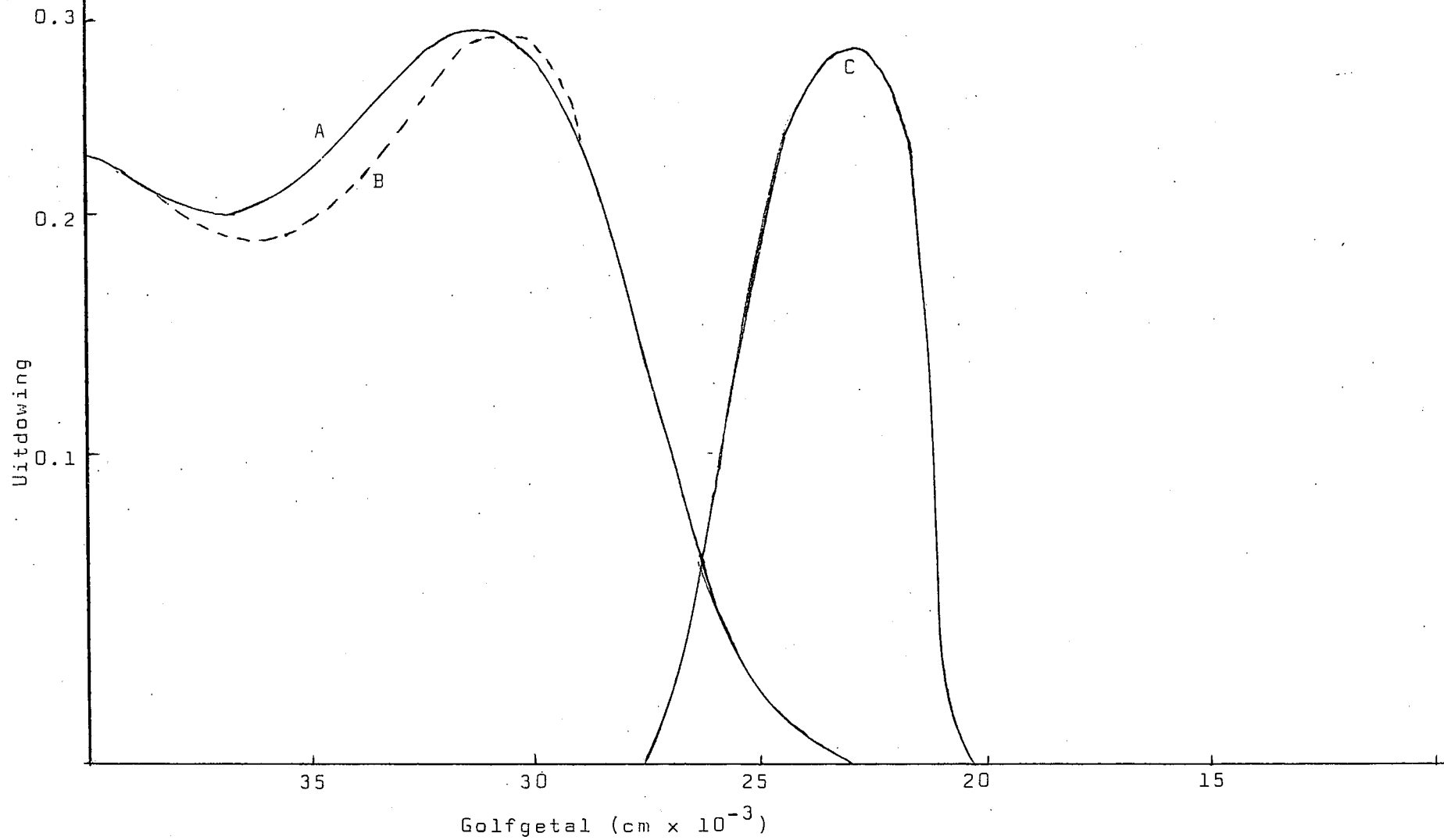
Bogenoemde onsimmetriese disulfied is vervolgens van die ander komponente op 'n Sephadex-kolom en ook deur middel van papierelektroforese geskei. In laasgenoemde geval is dit uit die papier geloog met trisbuffer (0.1 M, pH 7.4). Die absorpsiespektrum van die onsimmetriese disulfied, asook dié van monsters suiwer CNT en DTN, is vervolgens spektrofotometries bepaal. Die spektra word in figuur XI aangetoon. Die spektrum van die onsimmetriese disulfied stem goed ooreen met die van DTN, met 'n klein bathochromiese verskuiwing van 600 cm^{-1} na 'n langer golflengte. Die onsimmetriese disulfied toon, net soos DTN feitlik geen absorpsie by $412\text{ m}\mu$ nie.

(ii) Faktore wat by die DTN-bepalingsmetode van tiale inmeng:

Uit die inleidende bespreking het dit geblyk dat sekere disulfiede gebruik word as reagense om tiale te bepaal. Een van die metodes wat die meeste gebruik word, is dié een wat deur Ellman ontwikkel is en berus op die



Figuur X. Tweedimensionele feroogram van 'n oplossing van DTN en glutatioon. Na die eerste skeiding is die feroogram met 0.5% merkeptoëtanol gespuit. Ionoforese by 15 volt/cm en 0.5 mA/cm vir 3 uur in beide rigtings.



Figuur XI. Absorpsiespektra van
 A = DTN
 B = $\text{G-S-S-C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)\text{-COOH}$
 C = CNT
 in 0.1 M trisbuffer, pH 7.2.

reaksie van DTN met 'n tiol om 3-karboksi-4-nitrotiofenol te gee, wat kolorimetries bepaal word. (Hierdie reaksie word volledig in die bespreking behandel). Die absorpsiespektrum van DTN verskil heeltemal van dié van CNT en dit word algemeen aanvaar dat dit nie by die bepaling van laasgenoemde inmeng nie. Die moontlikheid het egter bestaan dat die onsimmetriese disulfied wat tussen DTN en tiol gevorm word, by die kolorimetriese bepaling van die CNT-ione kan inmeng, indien die absorpsiespektrum van hierdie disulfied baie van dié van DTN verskil.

Ons het so pas aangetoon dat die absorpsiespektra van DTN en die ooreenkomstige onsimmetriese disulfied feitlik identies is. Indien die DTN-konsentrasie geen invloed op die bepaling metode het nie, behoort dieselfde dus vir die onsimmetriese disulfied te geld. Gevolglik is die invloed van verskillende konsentrasies DTN op die kolorimetriese bepaling van 'n gegewe hoeveelheid tiol ondersoek. Die resultate word in tabel IV aangegee, en is verkry deur 0.2 mikromole glutatioon in 10 ml oplossings van DTN in pH 7.4 trisbuffer wat verskillende konsentrasies DTN bevat, te voeg en die uitdowing te bepaal.

TABEL IV

% DTN in die oplossing	Relatiewe Uitdowing
0.002	0.292
0.003	0.287
0.004	0.290
0.005	0.287
0.006	0.288

Uit ons resultate blyk dat die DTN-konsentrasie geen invloed op die kolorimetriese bepaling van die CNT-ione het nie, wat in-ooreenstemming is met die bevindings van Ellman¹⁰¹ by sy studie van bis-(p-nitrofeniel)disulfied. Dus kan met veiligheid aanvaar word dat die konsentrasie van die onsimmetriese disulfied in die reaksiemengsel geen invloed op die DTN-bepaling metode het nie.

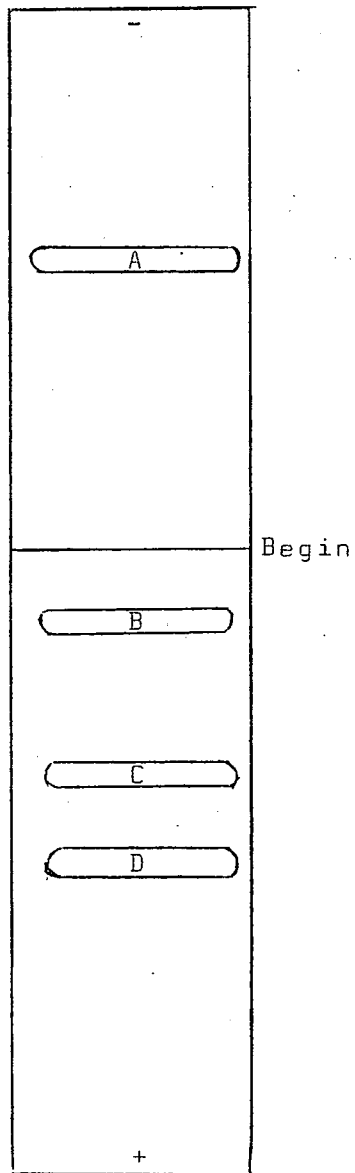
Alhoewel die onsimmetriese disulfied geen invloed op die DTN-bepaling metode het nie, is nogtans gevind dat die reaksiemengsel nie baie stabiel was onder die gegewe kondisies nie en dat daar 'n geleidelike verandering in die absorpsie by 412 m μ plaasgevind het. Aangesien die

oksidasie van CNT moontlik versnel kan word deur spore metaalsoute, is die dinatriumsout van etileendiamientetra- asynsuur (EDTA) gebruik as sekwestreerder om metaalsoute te verwyder en oksidasie te verhoed. Verder kan ultraviolet- lig ook by die bepalingmetode inmeng deurdat dit die disulfiedbinding homolities kan splits. Dit is vermy deur die eksperimente uit te voer in 'n kamer met wolframlampe as die enigste bron van lig; verder is die DTN-oplossings in donker houers bewaar. Ten spyte van al dié voorsorg- maatreëls was die reaksiemengsel nog steeds onstabiel en het die absorpsie by 412 m μ geleidelik verander.

Dit is bekend dat disulfiedbindings deur alkali gesplits kan word en die moontlikheid dat dit ook hier die geval kan wees, is vervolgens ondersoek. Die pH van die reaksiemengsel (0.1 M DTN en 0.1 M glutatioon, pH 7.4 trisbuffer) is verhoog tot 10 deur die byvoeging van 1.0 M NaOH-oplossing. Nadat die reaksiemengsel 30 minute by kamertemperatuur gestaan het, is 'n deelvolume in sy komponente geskei deur middel van hoogspanningselektroforese, waarna die ferogram gedroog en met ninhidrien gespuit is. Die ferogram het, afgesien van glutatioon en die onsimmetriese disulfied, nog 'n addisionele ninhidrienpositiewe band (van lae intensiteit) by posisie C getoon (figuur XII). Bogenoemde proses is herhaal by pH 11.5 en toe is gevind dat band B 'n skerp afname in intensiteit getoon het, terwyl band C baie sterker was as wat by pH 10.0 die geval was. Terselfdertyd is daar ook nog 'n verdere flou band gevorm by posisie D. Die ferogramme is vervolgens met $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ gespuit om die kleur te fikseer, die verskillende verbindings uitgeloog en die relatiewe intensiteite van die verbindings spektrofotometries bepaal volgens die metode van Wieland³⁸⁰. Volgens die resultate, wat in tabel V aangegee word, blyk dat verbindings C en D moontlik afkomstig kan wees van die ontbinding van die onsimmetriese disulfied.

TABEL V

Posisie	Verbinding	Relatiewe intensiteit	
		pH 5.0	pH 11.5
A	GSSG/GSH	0.73	1.05
B	Onsimmetriese disulfied	1.27	0.10
C	G-SO ₂ H	-	0.83
D	G-SO ₃ H	-	0.05



Figuur XII. Hoogspanningsferogram van h glutatioon/DTN-oplossing wat vir 80 minute by pH 11.5 gestaan het.

In kontrole-eksperimente is oplossings van glutatioon-disulfied (GSSG) asook DTN vir 30 minute by pH 11.5 gehou, waarna met behulp van elektroforese aangetoon is dat GSSG nie onder hierdie kondisies ontbind het om verbindings C en D te vorm nie. Terselfdertyd is spektrofotometries aangetoon dat DTN in 'n mate ontbind het. Bevestiging dat verbindings C en D afkomstig is van die ontbinding van die onsimmetriese disulfied, is verkry deur 'n monster suiwer G-S-S-C₆H₃(NO₂)-COOH (berei soos beskryf op bladsy 60) onder bogenoemde alkaliese kondisies te behandel. Na elektroforese van die reaksiemengsel is die teenwoordigheid van verbindings C, D en DTN/CNT soos voorheen op die ferogram aangetoon.

Daar is as volg te werk gegaan om verbindings C en D te identifiseer. Na elektroforetiese skeiding van die reaksiemengsel is 'n smal strokie van die ferogram afgesny en met ninhidrien gespuit om die posisies van verbindings C en D te bepaal, waarna hierdie twee verbindings met trisbuffer (0.1 M, pH 7.4) uit die res van die ferogram geloog is. Die absorpsiespektra van C en D is spektrofotometries bepaal. Nie een van die twee verbindings toon ligabsorpsie by 412 of 340 m μ nie, en gevolglik bevat hulle nie DTN of CNT nie.

Vir 'n verdere studie is verbindings C en D met 0.1 M HCl uit die ferogramme geloog. Nadat 'n voldoende hoeveelheid van elke verbinding verkry is, is die produkte met 6 M HCl gehidroliseer vir 6 uur by 100°C, waarna die suur op 'n roterende verdamper verwyder is. Die residue is opgelos in water en 'n deelvolume is deur middel van hoogspanningselektroforese in sy komponente geskei. Ontwikkeling van die ferogram het die teenwoordigheid van drie ninhidrienpositiewe verbindings aangetoon, wat in hul elektroforetiese mobiliteite ooreenstem met glisien-, glutamiensuur- en alaniensulfiensuurmerkers in die geval van verbinding C en glisien-, glutamiensuur- en sisteïensuurmerkers in die geval van verbinding D. Hierdie identifikasie is bevestig deur die hidrolisate van C en D op 'n outomatiese aminosuuranaliseerder in hulle komponente te skei. Die standaardprosedure wat normaalweg vir keratienhidrolisate gevolg word, is gebruik saam met 'n gewysigde elueringsprogram (sitraatbuffer, pH 2.98), soos beskryf deur Mellet²⁴⁹.

Uit ons resultate blyk dat verbindings C en D respektiewelik die sulfien- en sulfoonsuurderivate van glutatation moet wees. Die sulfoonsuurderivaat van glutatation is vervolgens berei vanaf glutatation deur permieresuuroksidasie, volgens die metode van Toennies³⁶¹. Met behulp van chromatografie en elektroforese is bevestig dat verbinding D en die sulfoonsuurderivaat van glutatation identies is. Weens die feit dat glutatation nie baie stabiel is nie, was dit nie moontlik om die sulfiensuurderivaat daarvan volgens normale metodes te berei nie. (Die glutatation word ontbind deurdat veral die γ -glutamiel-peptiedbinding baie maklik hidrolities gesplits word.)

Wanneer ekwimolare hoeveelhede sisteïen en DTN (0.1 M) by pH 10.0 of 11.5 gereageer is, is soortgelyke resultate verkry as wat by glutatation die geval was. In hierdie geval is verbindings C en D so sterk suur dat hulle nie elektroforeties van DTN geskei kon word nie en is die volgende metode gebruik om hulle te isoleer:-

Nadat die DTN/sisteïen-reaksiemengsel vir 30 minute by pH 11.5 gestaan het, is dit aangesuur tot pH 2.5 met asynsuur; 10 ml van die aangesuurde oplossing is met 400 mg aktiewe dierkool opgeskud (vir 15 minute) en daarna gefiltreer. Die proses is tweemaal herhaal. Al die aromatiëse verbindings word aan die dierkool geadsorbeer en wanneer 'n deelvolum van die gefiltreerde, kleurlose oplossing aan hoogspanningselektroforese onderwerp is, is gevind dat verbindings C en D bevredigend van mekaar geskei is. Verbinding C toon dieselfde elektroforetiese mobiliteit as 'n alaniensulfiensuurmerker, terwyl verbinding D en sisteïensuur ooreenstem. Bevestiging dat C wel alaniensulfiensuur en D sisteïensuur is, is verkry na chromatografie op 'n outomatiëse aminosuuranaliseerder met sitraatbuffer (pH 2.98) as elueermiddel²⁴⁹.

(iii) Bepaling van die tiolinhoud van 'n onoplosbare proteïen met behulp van die DTN-metode:

Keratien:

Merinowol (64% kwaliteit), waarvan die punte afgesny is, is opeenvolgend gewas in petroleum-eter (K.P. 60 - 80°C), 'n verdunde waterige oplossing van 'n nie-ioniese wasmiddel, water, alkohol en eter. Daarna is die wol in lug gedroog.

DTN-oplossing:

50 mg DTN en 20 mg EDTA is opgelos in 100 ml trisbuffer (0.1 M, pH 7.4). Daarna is die oplossing aangesuur met HCl tot pH 4.0 en in 'n donker houer bewaar. (Onder hierdie kondisies word die splitsing van die disulfiedbinding tot 'n minimum beperk en is die oplossing vir ten minste 'n maand stabiel; langer tye is nie ondersoek nie.)

Trisoplossing:

Tris-(hidroksiometiel)aminmetaan is opgelos in water om 'n 3 M oplossing te gee. (L.W. Hierdie is nie 'n buffer nie.)

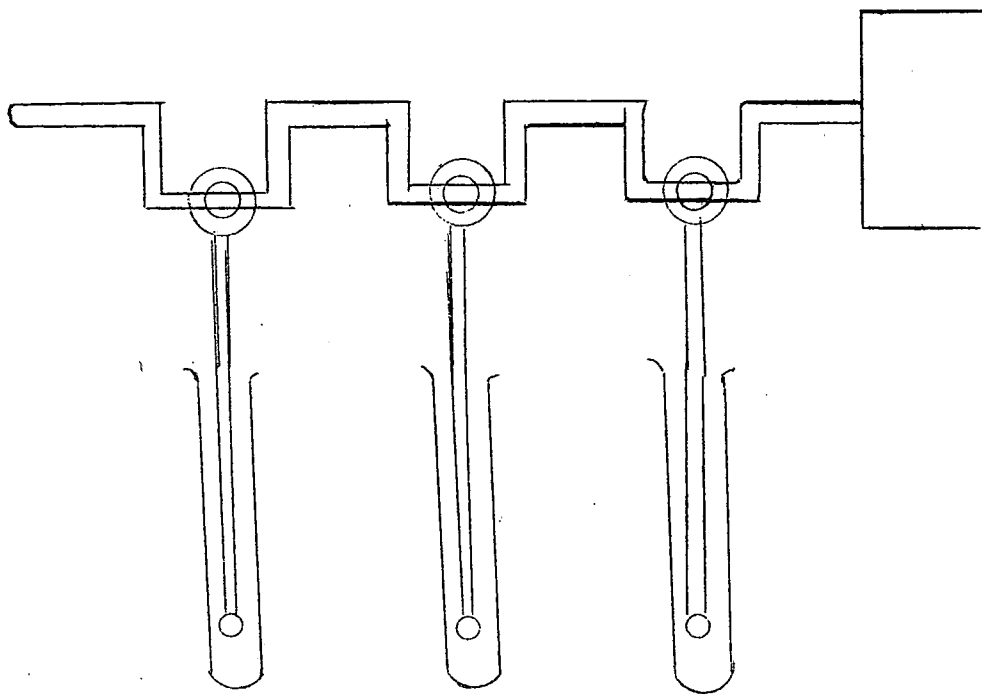
Hidrolise van die keratien:

'n Geskikte hoeveelheid wol (\pm 20 mg) is afgeweg in 'n proefbuis met lengte 7 cm en deursnit 1 cm. Hierby is 1 ml 15% H_2SO_4 -oplossing gevoeg, waarna die proefbuis in 'n termostaat (poliëtileenglikol) by $105^\circ C \pm 1^\circ C$ geplaas is tot die wol volledig opgelos het. Dit neem gewoonlik ongeveer 2 uur, maar daar is gevind dat die hidrolisetyd aansienlik verminder kan word deur die oplossing aanhoudend te roer met behulp van 'n gemotoriseerde glasstampertjie wat op en af in die proefbuis beweeg het met 'n frekwens van 2 siklusse per sekonde en amplitude 1 cm. (Figuur XIII). In hierdie ondersoek is wolmonsters gehidroliseer vir tye wat gewissel het van 30 tot 120 minute.

Bepalingsmetode:

Die hidrolisaat is vervolgens kwantitatief oorgewas in 10 ml trisbuffer (pH 7.4), en 1 ml DTN-oplossing is bygevoeg. Die pH van die oplossing is nog laer as 2 en in hierdie stadium is 2 ml trisoplossing (3 M) bygevoeg om die pH tot 7.4 te verhoog. Wanneer 'n proteïenhidrolisaat geanaliseer is, is gevind dat die CNT-anione vinniger vernietig word as wanneer glutatioon of sisteïen bepaal word en dus is die absorpsie by 412 m μ so gou moontlik nadat die trisoplossing bygevoeg is, gelees. Daarna kon die tiolinhoud direk van die molare uitdowingskoeffisiënt bereken word. Vaughan³⁶⁵ het die molare uitdowingskoeffisiënt van CNT-ione bepaal en gee dit aan as $\epsilon_{412} = 13,600$.

Ons het gevind dat die gevormde CNT-ione gerieflik bepaal kan word in spesiale proefbuise wat saam met 'n Coleman Junior spektrofotometer gebruik word. In al die gevalle is die verwysingsoplossing opgemaak deur 1 ml 15%



Figuur XIII. Motor met glasstampertjies vir keratienhidrolise.

H_2SO_4 te gebruik in die plek van die hidrolisaat. Voordat die bepalinge gedoen is, is eers 'n kalibrasielyn opgestel deur standaard sisteëne- of glutatienoplossings te gebruik. So 'n kalibrasielyn waarvan die tiolkonsentrasies afgelees is, word in figuur XIV aangetoon. Dit is gevind dat Beer se wet geldig is vir die konsentrasiegebied wat ondersoek is (0.0 - 0.08 μ M tiol/ml). Die resultate wat verkry is deur die tiolinhoud van 'n aantal wolmonsters volgens bogenoemde metode te bepaal, word in tabel VI aangegee. Wanneer die wol wat geanaliseer word 'n hoë tiolinhoud het, soos in die geval waar die wol met merkaptotoëtanol gereduseer is, is die hidrolisaat ooreenkomstig verder verdun.

TABEL VI

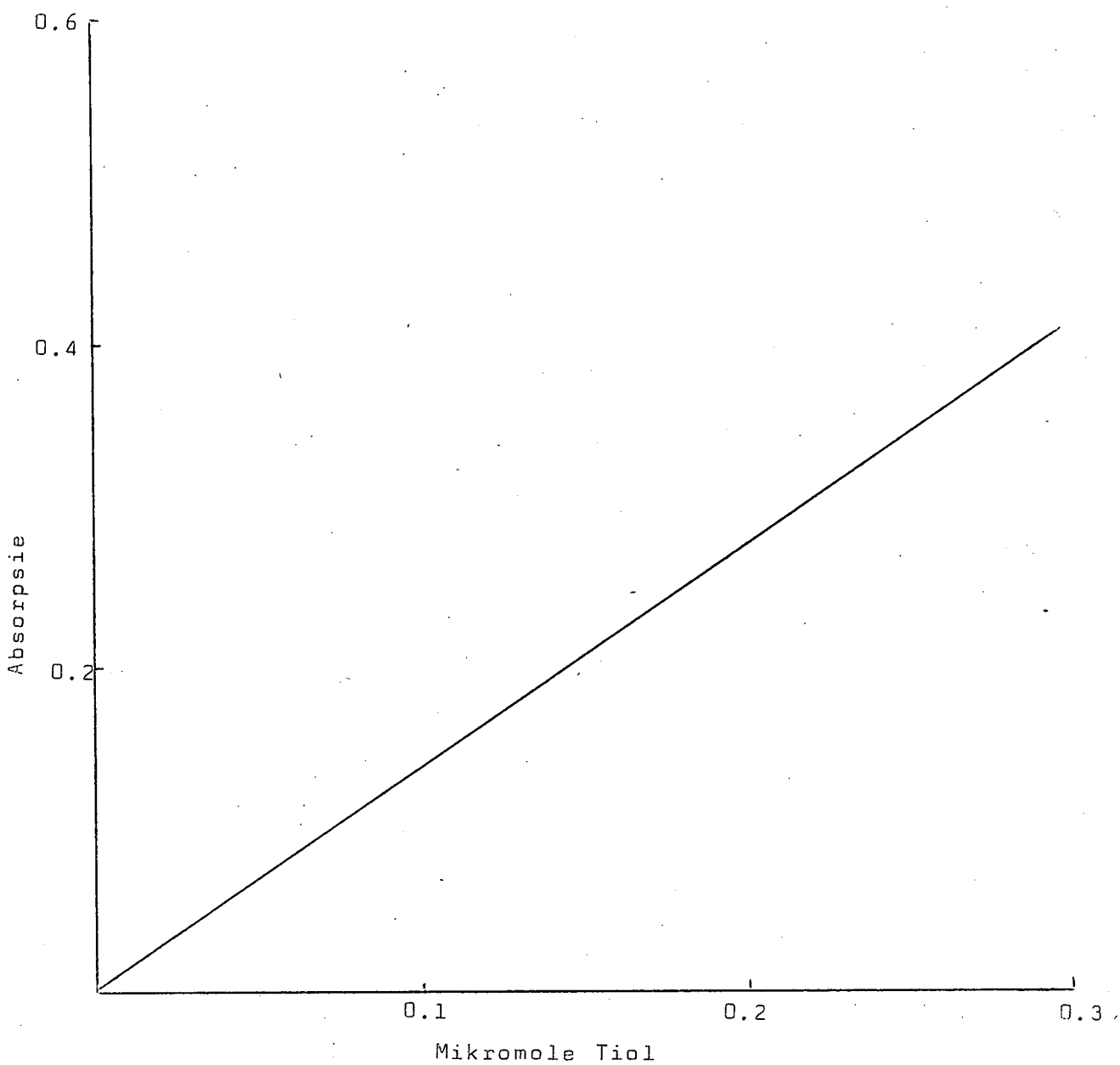
Wolmonster	Hidroliseertyd (minute)	Mikromole SH/gram wol
Onbehandel	30	30.0
	45	32.9
	60	32.7
	75	32.8
	90	32.6
	105	31.4
	120	30.8
Gereduseer*	45	772
	60	773
	75	768
	90	758
	105	752
	120	689

* Gereduseer vir 12 uur met 1% merkaptotoëtanol.

(iv) Amperometriese kontrolebepaling van die DTN-metode:

Apparaat en voorbereiding van die elektrode:

'n Metrohm-potensiograaf, Model E, met gesinchroniseerde motoraangedrewe buret en roterende platina-elektrode-eenheid met 'n polariseerder (deur dieselfde vervaardiger verskaf) is gebruik. Die platina-elektrode roteer teen 'n konstante spoed van 600 omwentelings per minuut. As verwysingselektrode is 'n Ag/AgCl-sel in 'n versadigde KCl-oplossing gebruik; 'n versadigde KNO_3 -brug wat 1.5% agar bevat, het elektriese kontak met die titrasie-



Figuur XIV. Kalibrasielyn vir die DTN-bepalingsmetode van tirole.

oplossing verskaf. Die potensiaal van die indikator-elektrode is konstant gehou by -0.15 volt (m.b.t. die Ag/AgCl-elektrode). Die standaard silwernitratoplossing (10^{-4} tot 5×10^{-4} M, afhange van die aantal tiolgroepe in die wol) is in die reaksie-medium ingelaat teen 'n tempo van 0.5 ml/min, terwyl die elektriese stroom op die gesinchroniseerde registreerder geregistreer is.

Die indikatorelektrode is daaglik as volg voorberei:- Die elektrode is met HNO_3 (1:1) skoongemaak en met water gewas. Die roterende platina-elektrode is versilwer met 'n 6-volt droësel-battery in 'n oplossing van 5×10^{-2} M $\text{KAg}(\text{CN})_2$. (Hierdie oplossing is berei deur 'n gekonsentreerde KCN-oplossing by 15 ml AgNO_3 -oplossing (0.1 M) te voeg tot die gepresipiteerde AgCN net opgelos het, en die oplossing dan op te maak tot 30 ml met water.) Sodra 'n goeie silwerbasis gevorm het, is die elektrode geëkwilibreer deur 'n werklike titrasie te doen en die apparaat vir nog 15 minute nadat die buret (5 ml) reeds leeg was, aan te los. Die doeltreffendheid waarmee die elektrode berei is, is geïllustreer deur die afwesigheid van enige „geraas“, selfs by instellings van die hoogste sensitiwiteit.

Prosedure gebruik by die amperometriese titrasie van tiolgroepe:

Die prosedure wat by al hierdie bepalinge gebruik is, is gebaseer op bepalingmetodes van Benesch^{21,23} en Kolthoff²⁰⁰, wat as volg deur Swanepoel³⁴⁸ gewysig is:- Die wolhidrolisaat is tot 25 ml verdun met water. By 40 ml etanol (96%) is 1 ml $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{NO}_3$ -buffer (8.3 M) gevoeg en die mengsel is vir 10 minute ontgas deur waterstof. Daarna is die hidrolisaat (0.5 of 1.0 ml) bygevoeg en die titrasie met die AgNO_3 -oplossing (10^{-4} M, in 92% etanol) begin. Die presipitaat wat gevorm word wanneer die hidrolisaat by die buffer-alkoholoplossing gevoeg word, bevat geen aminosure of peptiede nie*, maar is in werklikheid 'n klein hoeveelheid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wat as gevolg van die hoë alkoholkonsentrasie neergeslaan het. Dit het egter nie 'n merkbare invloed op die bufferkonsentrasie nie en geen aandag is verder hieraan geskenk nie.

* Bewys met behulp van ionuitruilingschromatografie op 'n outomatiese aminosuuranaliseerder.

Bogenoemde argentometriese metode is vervolgens gebruik om die tiolinhoud van 'n aantal wolmonsters, soos verkry met die DTN-metode, te kontroleer. Die verskillende wolmonsters is vir 45 minute gehidroliseer soos voorheen beskryf is (meganies geroer), voordat die bepalinge gedoen is, en die resultate word in tabel VII aangegee.

TABEL VII

Wolmonster	Behandeling	Mikromole SH/gram wol	
		DTN	Argentometries
A	Geen	31.8	31.5
B	Geen	31.0	31.4
C	Geen	30.3	29.9
D	Geen	26.6	26.7
E	Geen	25.5	25.4
F	Geen	24.0	23.6
G	Bestraal met ultravioletlig	121	125
H	Gereduseer	813	797
I	Gereduseer	392	398

- G. Bestraal vir 20 uur met 'n hoë-druk Hanovia-lamp
H. Gereduseer met 1% merkptoëtanol vir 12 uur
I. Gereduseer met 1% merkptoëtanol vir 1½ uur

XII. DIE REAKSIE VAN HIPOFOSFIETIONE MET SISTIEN

(i) Die liq-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reduksie-reaksie:

Onderzoek na die golflengte van die liq wat die reduksie van sistien deur hipofosfietione induseer:

Hanovia-lamp:

Die spektrum van 'n hoë-druk-kwikontledingslamp van 360 watt is spektrofotometries bepaal en word in figuur XV aangegee.

Phillips-„germicidal“-lamp:

Die spektrum van bogenoemde lamp (30 watt) is soos in die geval hierbo bepaal en word aangegee in figuur XVI.

Filters:

Die absorpsiespektra van CCl_4 en 'n 6% $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -oplossing is met behulp van die spektrofotometer bepaal (kwartsselle met 'n padlengte van 10 mm) en word aangegee in figure XV en XVI.

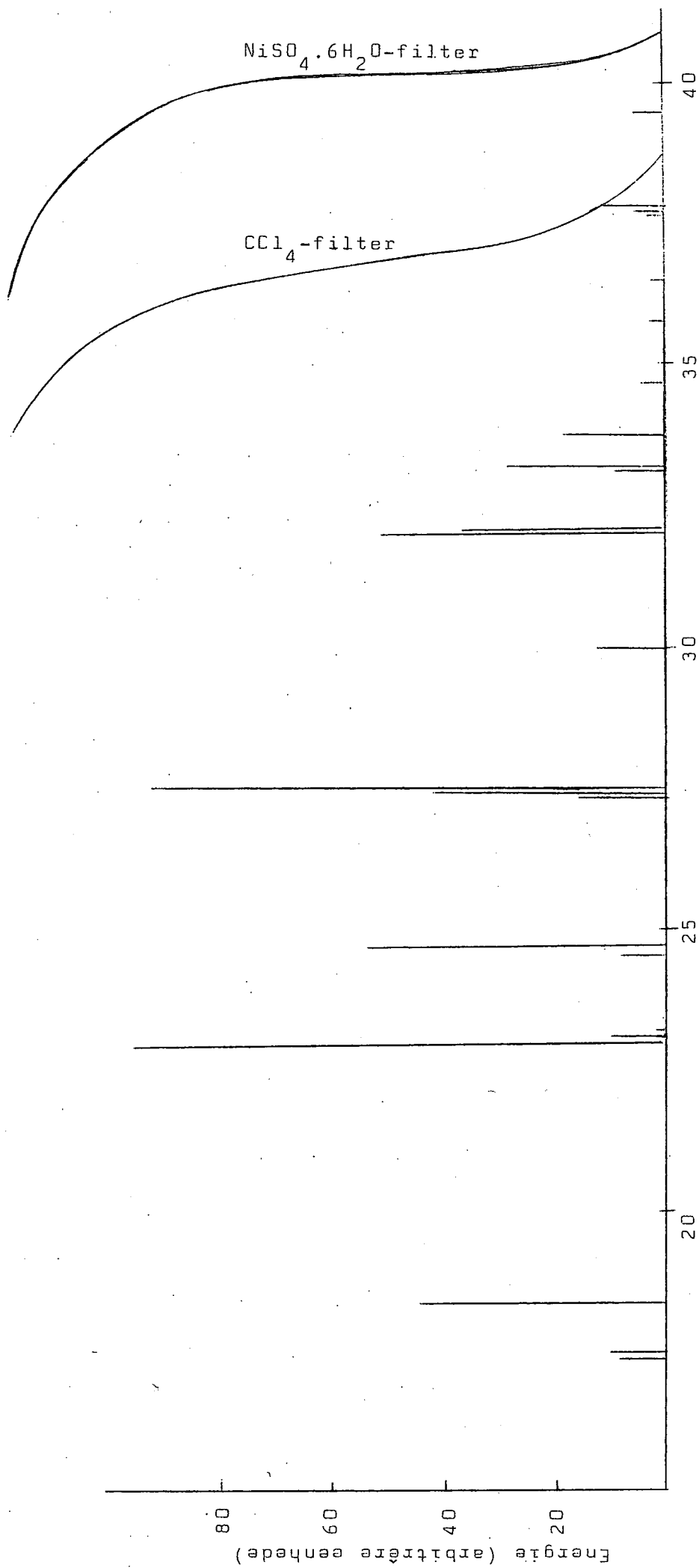
Bestralings:

'n Oplossing van sistien (10^{-3} M) en natriumhipofosfiet (1.5×10^{-3} M) in 0.1 M HCl is vir 60 minute bestraal in 'n kwartssel (padlengte 10 mm) op 'n afstand 50 cm vanaf die Hanovia-lamp of 7.5 cm vanaf die Phillips-lamp. Daarna is deur middel van die sianied-nitroprussiedreagens bewys dat reduksie in albei gevalle plaasgevind het. Vervolgens is 'n filter (10 mm padlengte sel) van 'n 6% $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -oplossing voor die sistien/hipofosfietoplossing geplaas en na 'n bestraling van 60 minute is weer eens gevind dat reduksie in albei gevalle plaasgevind het. Wanneer die NiSO_4 -filter egter deur CCl_4 vervang word, is feitlik geen reduksie van die sistien ondervind nie. Vanuit die kurwes in figure XV en XVI blyk dat die Phillips-lamp die meer eenvoudige spektrum het, en alle bestralings is vervolgens daarmee gedoen.

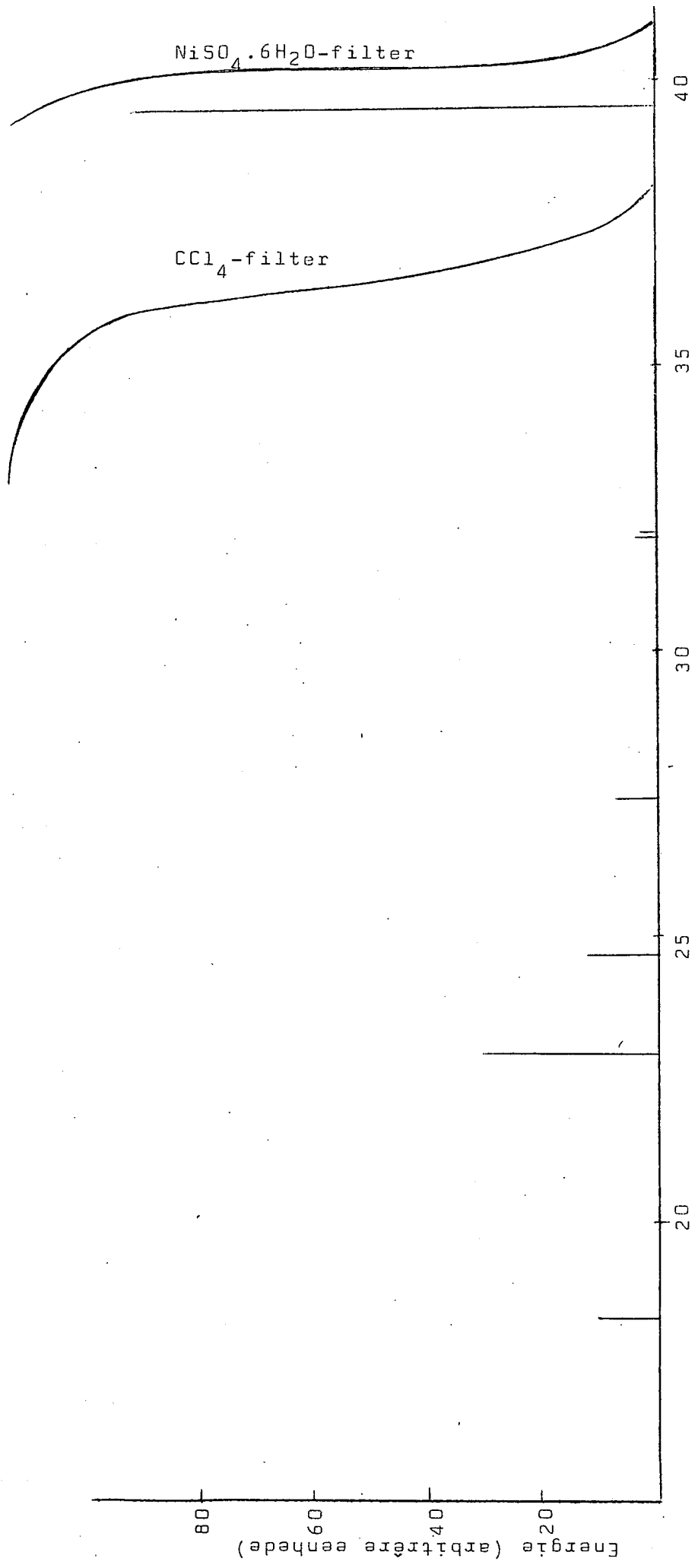
Bepaling van die kwantumopbrengste van sisteien in bestraalde sistien/hipofosfietoplossings:

Keuse van 'n aktinometer:

Kwantum-intensiteite kan gemeet word met foto-elektriese selle, termosuile of chemiese aktinometers.



Figuur XVI. Emissiespektrum van h Hanovia-lamp.



Figuur XVI. Emissiespektrum van 'n Phillips-lamp.

Na 'n deeglike studie het Noyes²⁶⁴ tot die slotsom gekom dat laasgenoemde die betroubaarste resultate gee. Die bekendste chemiese aktinometer is ongetwyfeld dié een wat gebruik maak van die fotochemiese ontbinding van oksaalsuur in oplossings van oksaalsuur/uranieloksalaat³⁷. Hierdie bepalingmetode berus egter op titrasie van die fotolitiese produkte en omdat groot volumes oplossing hiervoor nodig is, asook lang bestralingstye in die geval van lae bestralingsdosisse, is dié metode nie altyd baie geskik nie.

Aktinometers waarvan die produkte van fotolise direk bepaal kan word bv. spektrofotometries, is nie alleen meer akkuraat as bogenoemde metode nie, maar ook makliker hanteerbaar. Parker²⁶⁸ het bv. 'n chemiese aktinometer ontwikkel wat baie gevoeliger as die uranieloksalaat-aktinometer is. Dit berus op die ontbinding van kaliumferrioksalaat na ferrosoute, en die spektrofotometriese bepaling van die ferro-ione. Hierdie metode het egter die nadeel dat die oplossings wat gebruik word, ligsensitief is (selfs dowwe elektriese lig ontbind dit) sodat die bepaling in 'n donker kamer gedoen moet word.

Moroson en Gregoriades²⁶¹ het onlangs 'n aktinometer beskryf wat nie alleen baie akkuraat is nie, maar ook stabiel is onder gewone laboratoriumkondisies. Omdat hierdie metode slegs klein volumes reagens benodig en die bepaling baie eenvoudig is, is besluit om dit te gebruik in hierdie ondersoek. Dié metode maak gebruik van die feit dat bensoësuuroplossings wat met ultravioletlig bestraal word, salisielsuur gee in opbrengste wat direk eweredig is aan die dosis van bestraling. Die gevormde salisielsuur word fluorimetries bepaal. Nadat die aktinometer teen 'n standaard bestralingsbron gestandaardiseer is, is dit moontlik om bestralingsdosisse vinnig en akkuraat volgens hierdie metode te bepaal²⁶¹.

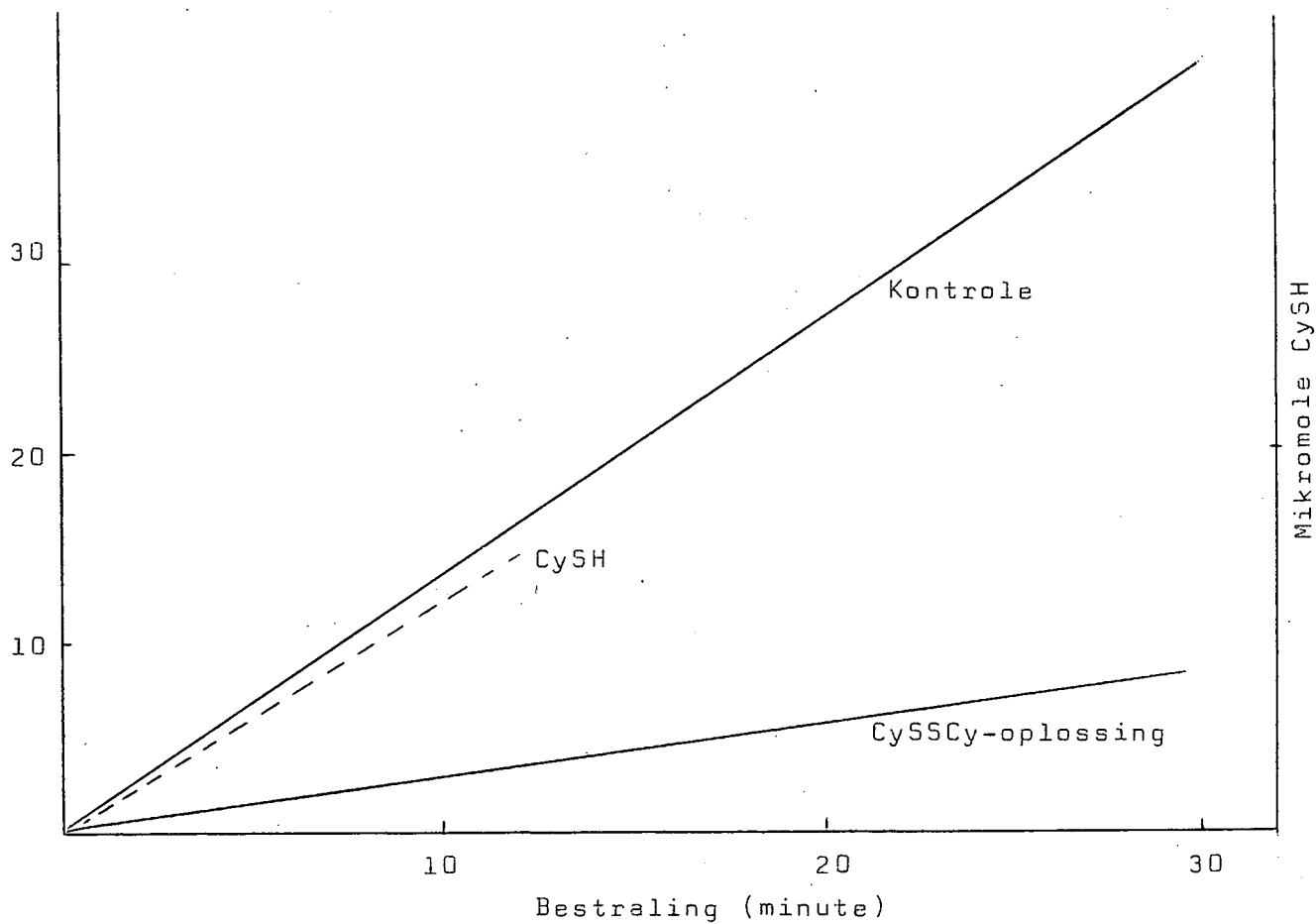
Bepaling van die bestralingsdosisse:

'n Beckman Fluorometer (met opwekking by 320 m μ en sekondêre filter vir die deurlating van die fluoressente lig by 405 m μ) is gebruik. Dit is gestandaardiseer met natriumsalisilaat in 0.01 M NaOH-oplossing. ('n Liniêre standaardisasielyn is verkry vir salisielsuurkonsentrasies tussen 0 en 10^{-6} M). By die bepaling van die fluoressensie na bestraling is die instrument ingestel op 0% fluoressensie

met 10^{-3} M bensoësuur in 0.01 M NaOH-oplossing terwyl 100% fluoressensie ingestel is met 10^{-6} M salisielsuur in 0.01 M NaOH-oplossing. Twee houers wat elk drie standaard spektrofotometerselle (padlengtes 10 mm) in serie kan hou, is op 'n afstand van 7.5 cm van die Phillips-lamp bestraal. Die voorste selle (naaste aan die lamp) het in albei gevalle 'n 6% $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -oplossing bevat. Die middelste selle het die sistien/hipofosfiet/HCl-reaksiemengsel in die een geval en 'n kontrole hipofosfiet/HCl-oplossing (van dieselfde konsentrasie) in die ander geval bevat, terwyl die derde selle in albei gevalle 3.5 ml van 'n 10^{-3} M bensoësuuroplossing in 10^{-2} M NaOH bevat het. Na die bestraling is die inhoud van die derde selle oorgedra in die kwartshouers van die fluorometer en die fluoressensie van albei monsters bepaal, terwyl die sisteïeninhoud van die middelste sel bepaal is volgens die DTN-metode.

'n Ondersoek na die liniêriteit van die aktinometer met betrekking tot die dosis van bestraling:

'n Oplossing van 0.01 M sistien en 0.02 M natrium-hipofosfiet in 0.1 M HCl is in die middelste sel geplaas; by die ander houer bevat die ooreenkomstige sel 'n hipofosfiet/HCl-oplossing wat as kontrole dien. Na bestralings vir verskillende tye is die fluoressensie en tiolinhoud bepaal soos hierbo beskryf is. Die resultate wat verkry is, word in figuur XVII aangegee. Die fluoressensie word as 'n funksie van bestralingsduur aangegee en uit die figuur blyk dit dat daar 'n liniêre verband tussen hierdie twee bestaan, vir die tye ondersoek. In 'n kontrole-eksperiment is die voorste NiSO_4 -filters vervang deur CCl_4 -filters. Nadat vir 30 minute bestraal is, is gevind dat die fluoressensie van die aktinometer ooreenkom met dié van 'n monster onbestraalde bensoësuur. Gevolglik het daar geen omsetting na salisielsuur onder bogenoemde kondisies plaasgevind nie, wat beteken dat onder hierdie omstandighede alleen daardie golflengte ultravioletlig (254 m μ) wat die sistien/hipofosfiet reduksie inisieer, die Moroson-aktinometer aktiveer.



Figuur XVII. Fluoressensie van 'n aktinometrische oplossing as 'n funksie van bestralingsduur.

Bepaling van die kwantumintensiteit van die Phillips-lamp:

Die opening van die selhouer het 'n oppervlakte van 2 cm^2 en vanaf die grafiek in figuur XVII blyk dat $0.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ salisilaat gevorm is na 'n bestraling van 30 minute. Die kwantumopbrengs van silisilaat is volgens Moroson 0.081 en dus word $0.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ salisilaat gevorm deur 4.95×10^{-6} molkwanta. In 30 minute word 'n dosis van 4.95×10^{-6} molkwanta deur 2 cm^2 deurgelaat en dus is die kwantumintensiteit van die Phillips-lamp op 'n afstand van 7.5 cm:

$$8.23 \times 10^{-8} \text{ Nh} \text{ /min/cm}^2.$$

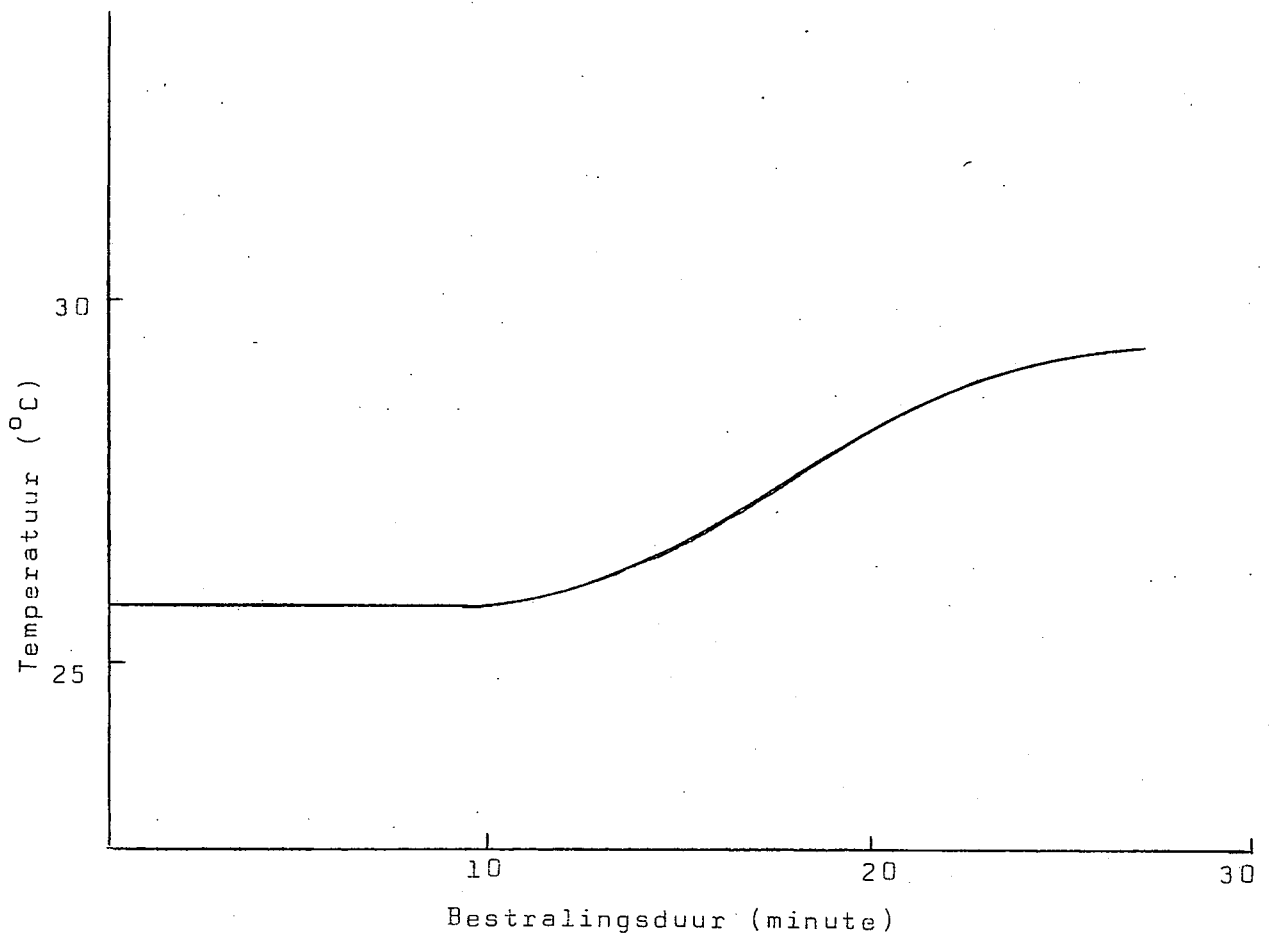
Die invloed van temperatuur:

Volgens Noyes en Boekelheide²⁶⁴ het temperatuur-skommelings 'n merkbare invloed op fotochemiese reaksies, want die absorpsiekoëffisiënte van die oplossing en die snelheid van sekondêre prosesse, sowel as die opbrengste by primêre prosesse, kan verskil by verskillende temperature. Dit is dus noodsaaklik dat die temperatuur van die reaksiemengsel beheer moet word. Daar is as volg te werk gegaan om vas te stel of daar temperatuursveranderings plaasvind gedurende die bestralingseksperimente: 'n termokoppel, wat aan 'n registreerder verbind is, is in die reaksiesel geplaas en die oplossing is bestraal onder die kondisies wat hierbo genoem is. Die temperatuur is bepaal as 'n funksie van tyd en die resultaat word in figuur XVIII aangegee. Dit is duidelik dat daar 'n geleidelike styging in die temperatuur van die oplossing voorkom by bestralings van langer as 10 minute, en om moontlike komplikasies te voorkom, is al die bestralings vir 'n konstante tyd van 10 minute gedoen.

Berekening van die kwantumopbrengs Φ :

In die bepaling van Φ is die sistien/hipofosfiet-oplossings (van verskillende konsentrasies in 0.1 M HCl) vir 10 minute bestraal op 'n afstand 7.5 cm vanaf die Phillips-lamp, waarna die fluoressensie en tiolinhoud van die onderskeie oplossings bepaal is soos wat hierbo beskryf is. Die kwantumopbrengs van sisteïen is bereken volgens die volgende voorbeeld:-

Die fluoressensie van die aktinometriese oplossing vir die sistienmonster was 2.9%, terwyl dié van die kontrole 13.3% was. (10^{-6} M natriumsalisilaat = 100%). Terselfdertyd is 2.02×10^{-6} mole sisteïen in die bestraalde oplossing gevorm. Na die bestraling is die verskil in fluoressensie



Figuur XVIII. Temperatuurtoename van n sistien/
hipofosfietoplossing in 0.1 M HCl
wat op n afstand 7.5 cm vanaf n
Phillips-lamp bestraal is.

tussen die kontrole en reaksie monsters:

$$F_k - F = 13.3 - 2.9\% \\ = 10.4\%$$

In 3.5 ml bensoësuuroplossing is gevorm:

$$\frac{10.4}{100} \times 10^{-6} \times \frac{3.5}{1000} \text{ mole salisilaat} \\ = 3.64 \times 10^{-10} \text{ mole salisilaat.}$$

Volgens Moroson²⁶¹ is die kwantumopbrengs van hidroksi-bensoësuur by pH 12.0:

$$= 0.081$$

Gevolglik word 3.64×10^{-10} mole salisilaat gevorm deur:

$$\frac{100}{8.1} \times 3.64 \times 10^{-10} \text{ kwanta} \\ = 4.49 \times 10^{-9} \text{ kwanta.}$$

Aangesien 2.02×10^{-6} mole sisteien deur 4.49×10^{-9} kwanta lig gevorm word, is die kwantumopbrengs van sisteien vir bogenoemde bestraling:

$$= 450 \text{ mol/kwantum}$$

Die kwantumopbrengste is vir verskeie gevalle bepaal en die resultate word in tabel VIII aangegee:

TABEL VIII

H ₃ PO ₂ -konsentrasie (M)	Sisteienkonsentrasie (M)	Kwantumopbrengs van sisteien (Φ)
0	5×10^{-3}	0.2
5×10^{-4}	5×10^{-3}	24
3×10^{-3}	5×10^{-3}	73
2×10^{-2}	5×10^{-3}	85
5×10^{-2}	5×10^{-3}	102
1×10^{-1}	5×10^{-3}	167
2×10^{-1}	5×10^{-3}	337
3×10^{-1}	5×10^{-3}	620
4×10^{-1}	5×10^{-3}	675
5×10^{-1}	5×10^{-3}	665
2×10^{-2}	1×10^{-3}	82
2×10^{-2}	2×10^{-3}	88
2×10^{-2}	5×10^{-3}	85
2×10^{-2}	1×10^{-2}	97
2×10^{-2}	5×10^{-2}	96

- (ii) Induksie* van die sistien/hipofosfiet-reduksie-reaksie deur middel van radikaalinisiators van 'n chemiese aard:

Bepaling van die persentasie reduksie verkry by die radikaal-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reaksie:

By 'n oplossing van sistien (2×10^{-4} M) in 0.1 M HCl (wat verskillende konsentrasies natriumhipofosfiet bevat), is waterstofperoksied- en ferroammoniumsulfaatoplossings van verskillende konsentrasies gevoeg, daarna is die reaksiemengsel vir 1 minuut geskud waarna 'n deelvolum (1 ml) by 1 ml van 'n versadigde oplossing van EDTA in water gevoeg is om die metaalione te sekwestreer en sodoende enige oorblywende inisiator te vernietig. Nadat die oplossing vir ongeveer 1 minuut geskud is, is 9 ml trisbuffer (pH 7.4), 1 ml DTN-oplossing en 2 ml trisoplossing (3 M) bygevoeg en die absorpsie by 412 m μ gelees teen 'n verwysingsmonster wat nie sistien bevat nie. Die persentasie reduksie verkry, word in tabel IX weergegee as die aantal tirole gevorm per maksimum aantal tirole moontlik.

TABEL IX

Medium	H ₂ O ₂ (M)	Ferroammonium- sulfaat (M)	NaH ₂ PO ₂ (M)	% Reduksie
0.1 M HCl	0	0	0.1	0
	10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁴	0	0
	0	5 × 10 ⁻⁴	0.1	0
	4 × 10 ⁻⁴	0	0.1	0
0.1 M HCl	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	0.01	16.2
	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	0.10	61.3
	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	1.00	68.5
Asetaat- buffer pH 4.7	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	0.01	16.0
	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	0.10	64.5
	10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	1.00	69.5

'n Onderzoek na die reaksieprodukte gevorm by die radikaal-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reduksie:

By 5 ml van 'n oplossing van sistien (0.001 M) en natriumhipofosfiet (0.1 M) in 0.1 M HCl is 100 μ l waterstofperoksiedoplossing (3%) en 100 μ l ferroammoniumsulfaat (3%-oplossing) gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 'n paar sekondes

* Hierdie induksiereaksies is almal by kamertemperatuur in 'n donkerkamer ondersoek.

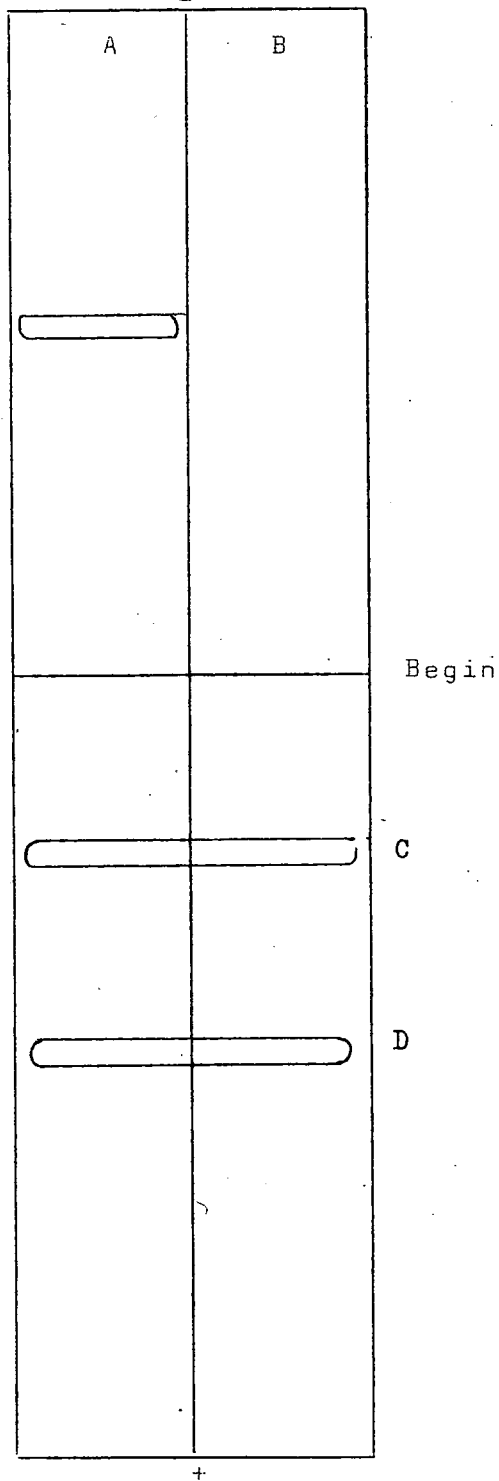
geskud en toe is 50 μ l hiervan deur middel van hoogspannings-elektroforese in sy komponente geskei. Nadat die ferogram gedroog is, is die papier in twee stroke gesny, waarvan die een met 'n fosforreagens¹⁶⁵ en die ander met ninhidrien-oplossing gespuit is. Ontwikkeling van die kleure het, afgesien van sistien, die teenwoordigheid van twee verbindings C en D (figuur XIX) getoon, wat albei ninhidrienpositief en fosfor-bevattend is. Hierdie twee verbindings stem in elektroforetiese mobiliteite ooreen met die twee verbindings wat volgens die foto-induksiemetode van Swanepoel³⁴⁸ berei is en wat reeds voorheen geïdentifiseer is as 'n fosfoniumtipe dubbelsout $[(H_2O_2)^+PSCy]^-SCy$ in die geval van C en 'n kwadrikovalente fosforanielradikaal $(H_2O_2)^-PSCy$ in die geval D (Cy = HOOC-CH(NH₂)-CH₂-).

Herhaling van die inisiasieproses in asetaatbuffer (0.1 M, pH 4.7) in plaas van 0.1 M HCl, het dieselfde twee intermediêre reaksieprodukte as wat hierbo beskryf is, gegee.

(iii) Die termies-geïnduseerde reduksie van sistien deur hipofosfietione:

'n Onderzoek na die tydsverloop voordat die termies-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reduksie 'n aanvang neem:

'n Oplossing van sistien (10^{-3} M) en natriumhipofosfiet (0.1 M) in asetaatbuffer (4 M, pH 5.2) is in 'n termostaat in 'n donkerkamer by 60°C of 80°C gehou. Elke 5 minute is 'n deelvolume (1 ml) van hierdie oplossing onttrek en 'n tiolbepaling daarop gedoen met behulp van die DTN-metode. Nadat daar vir 'n lang tydsverloop geen reaksie was nie, is 'n skielike drastiese toename in die tiolinhoud gevind. Tipiese gevalle word in tabel X aangegee:



Figuur XIX. Hoogspanningsferogram van h
sistien/hipofosfieloplossing
wat met h chemiese radikaal-
opwekker behandel is.

A is met ninhidrien gespuit.

B is met h fosforreagens gespuit.

TABEL X

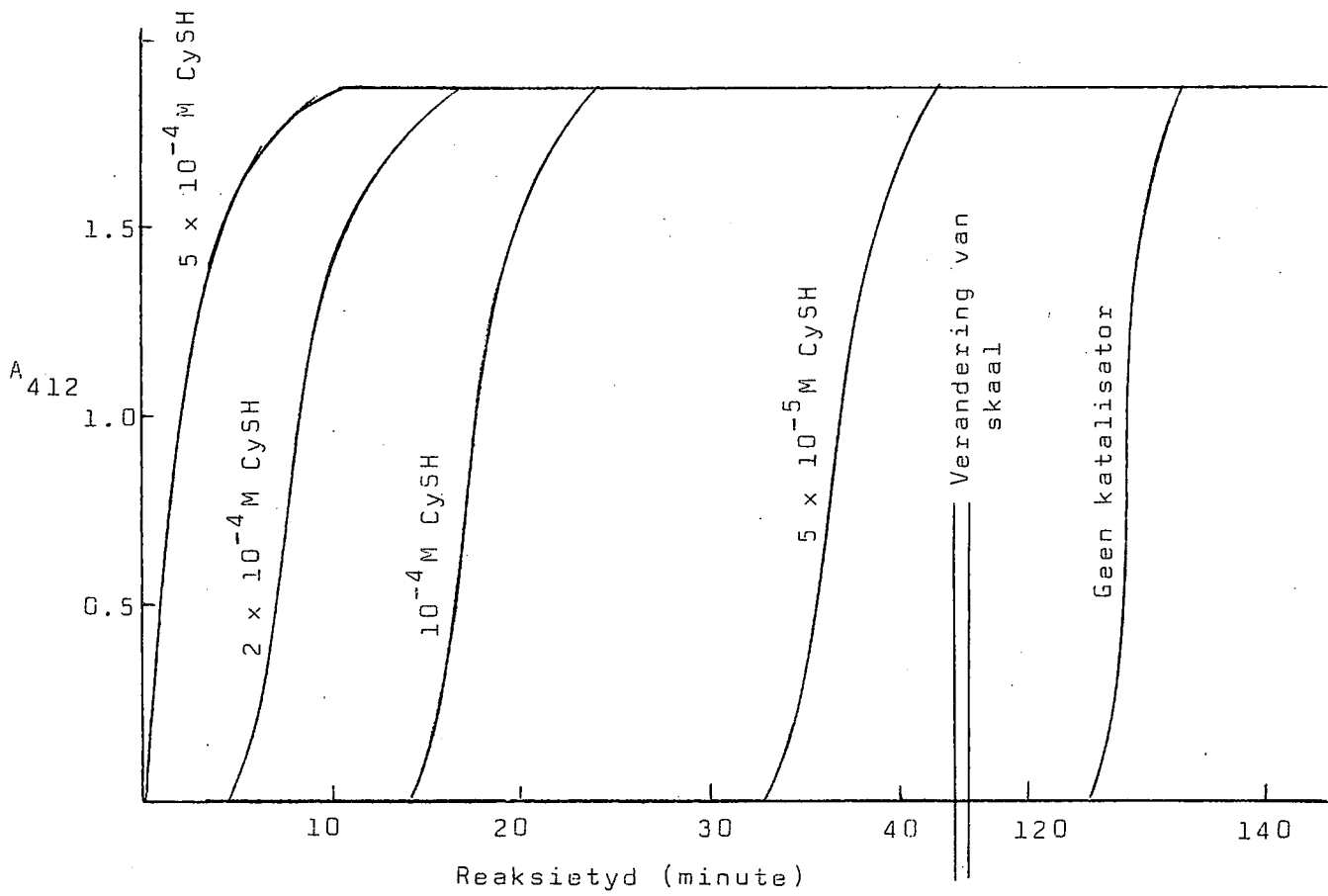
Reaksie-tyd (minute) by pH 5.2	A_{412}							
	60°C		80°C					
5	0.020	0.025	0.035	0.040	0.032	0.028	0.030	0.031
10	0.018	0.021	0.038	0.041	0.034	0.031	0.040	0.032
15	0.028	0.025	0.041	0.041	0.032	0.930	1.90	0.035
20	0.024	0.029	0.037	0.980	0.035	1.90		0.035
25	0.025	0.030	0.040	1.90	0.039			0.039
30	0.029	0.035	0.037		0.710			0.900
35	0.031	0.030	0.830		1.90			1.90
40	0.027	0.030	1.90					
60	0.032	0.027						
100	0.035	0.035						
120	0.040	1.90						
140	1.90							

Hoewel hierdie reduksie konsekwent plaasgevind het, blyk uit ons resultate dat die tydsverloop voordat reaksie ondervind is, nie baie reproduseerbaar is nie. Berekening van die persentasie reduksie het getoon dat sisteien kwantitatief gevorm is in al die gevalle wat ondersoek is. Wanneer deelvolumes van bogenoemde reaksiemengsels deur hoogspannings-elektroforese in hul komponente geskei is, is gevind dat sisteien die enigste ninhidrienpositiewe verbinding is, en dat geen dubbelsout of fosforanielradikaal teenwoordig is nie.

Bogenoemde reaksies is ook herhaal in 0.1 M HCl-medium of 0.1 M ammoniumhidroksied-ammoniumchloriedbuffer (pH 9.3), maar in geeneen van hierdie gevalle is enige reduksie ondervind vir die tye wat ondersoek is nie.

Die induksie van die sistien/hipofosfiet-reduksie deur katalitiese hoeveelhede tiol:

By 20 ml oplossings van sistien (10^{-3} M) en natrium-hipofosfiet (0.1 M) in asetaatbuffer (4 M, pH 5.2) is 20 μ l oplossings van sisteienhydrochloried in water gevoeg om die volgende konsentrasies tiol in die finale volume te gee: 5×10^{-5} , 10^{-4} , 2×10^{-4} en 5×10^{-4} M. Die oplossings is by 60°C in 'n termostaat in 'n donkerkamer gehou, terwyl 1.0 ml deelvolumes elke 5 minute onttrek en met DTN behandel is, soos voorheen beskryf is. Die absorpsie by 412 m μ is vir elke monster bepaal en word aangegee as 'n funksie van tyd in figuur XX.

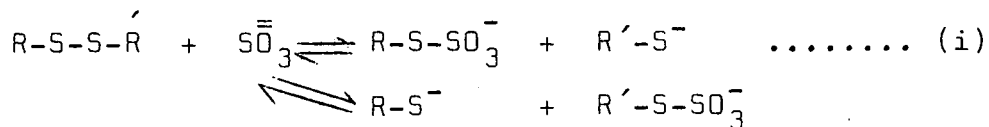


Figuur XX. Die induksie van die sistien/hipofosfiet-reduksie deur katalitiese hoeveelhede tiol.

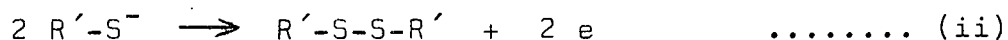
Bogenoemde reaksie is ook herhaal in 0.1 M HCl, trisbuffer (pH 7.4, 0.1 M) en ammoniumhidroksied-ammoniumchloriedbuffer (pH 9.3, 0.1 M), maar in geeneen van hierdie gevalle is enige reduksie verkry nie. In laasgenoemde twee gevalle is in werklikheid gevind dat die hoeveelheid tiol wat bygevoeg is, met verloop van tyd verminder het.

XIII. DIE REAKSIE VAN SULFIETIONE MET ONSIMMETRIESE
DISULFIEDE

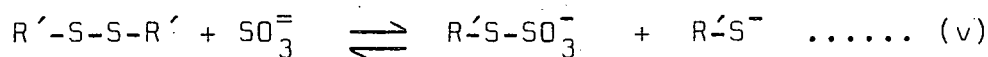
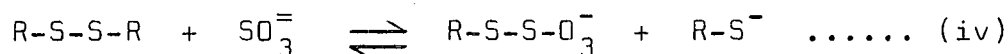
'n Kompliserende faktor by sulfitolises is die omkeerbaarheid van die reaksie. Dit is bewys⁵⁸ dat hierdie reaksie volledig omkeerbaar is by pH 9, sodat die volgende moontlike ewewigte bestaan in die reaksie met 'n onsimmetriese disulfied:-



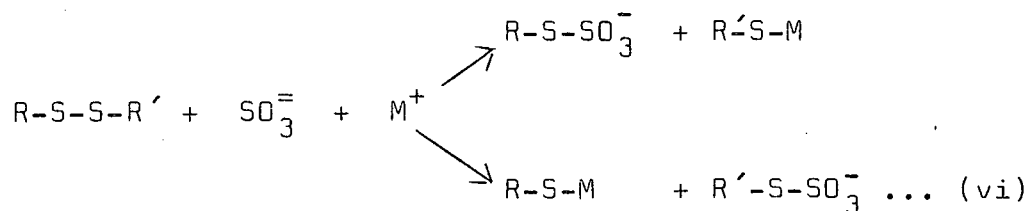
Hierdie reaksies word gewoonlik in neutrale of effens alkaliese medium uitgevoer en dit is bekend³⁵⁵ dat tirole baie maklik onder hierdie kondisies na disulfiede kan oksideer, veral in die teenwoordigheid van sekere metaal-soute:-



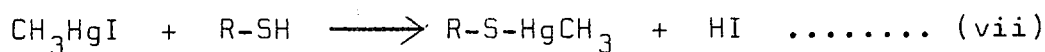
Sulke syreaksies kan die vertolking van die resultate baie bemoeilik deurdat die sekondêr gevormde disulfied nou weer met sulfietione reageer en 'n verdere stel ewewigte by die reaksie betrokke raak:-



Die hele reaksiesisteen kan baie vereenvoudig word indien die reaksie uitgevoer word in die teenwoordigheid van 'n reagens wat spesifiek en vinnig met tirole reageer. Nie alleen sal oksidasie verhinder word nie, maar die ewewig van die sisteem sal ook heeltemal na regs verplaas word:



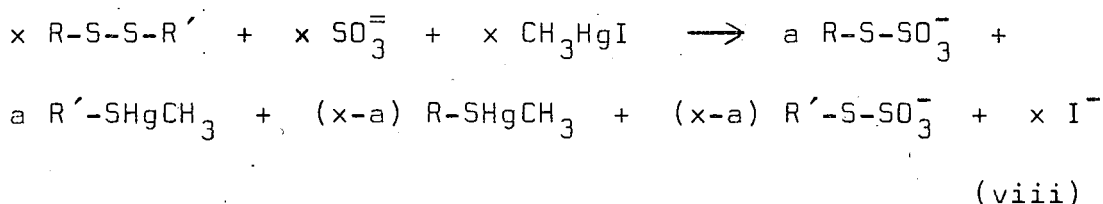
CH₃HgI is gekies as reagens om die gevormde tiolgroepe te blokkeer. Reeds in 1947 het Hughes^{171,172} aangetoon dat hierdie reagens monofunksioneel en baie spesifiek vir tiol-groepe is:-



Verder het dit die voordeel dat dit stabiel is in die teenwoordigheid van sulfietione²¹⁴.

CH_3HgI is besonder reaktief en uit die eksperimentele deel blyk (figuur VI) dat hierdie reagens vinnig genoeg met enige tipe tiol wat in dié ondersoek gebruik is, reageer om moontlike komplikasies deur oksidasie te verhinder. Hoewel algemeen aanvaar word dat CH_3HgI nie met disulfiedbindings reageer nie, het uit hierdie ondersoek duidelik geword dat daar wel een uitsondering bestaan, nl. die onsimmetriese disulfied sisteïen-sisteamien, wat by hoë pH-waardes deur CH_3HgI ontbind word om sulfien- en sulfoonsure te vorm. Daar is beweer⁵⁸ dat sekere swaarmetaalverbindings in staat is om disulfiede aan te val met die vorming van sulfien- en sulfoonsure. Sulke reaksies vereis gewoonlik drastiese kondisies en dit is verbasend dat sisteamien-sisteïen onder baie milde kondisies reeds begin ontbind. Geeneen van die ander onsimmetriese disulfiede word onder soortgelyke kondisies ontbind nie en geen verklaring kan vir hierdie reaksie gegee word nie.

Indien die reaksie uitsluitlik volgens vergelyking (vi) plaasvind, kan, deur die hoeveelhede R-S-SO_3^- en $\text{R}'\text{-S-SO}_3^-$ wat gevorm word, te vergelyk, maklik vasgestel word of die sulfietioon enige voorkeure toon in sy reaksie met die twee swaelatome van die onsimmetriese disulfied. Uit vergelyking (viii):-

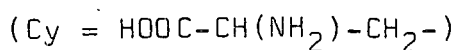
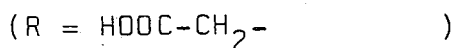
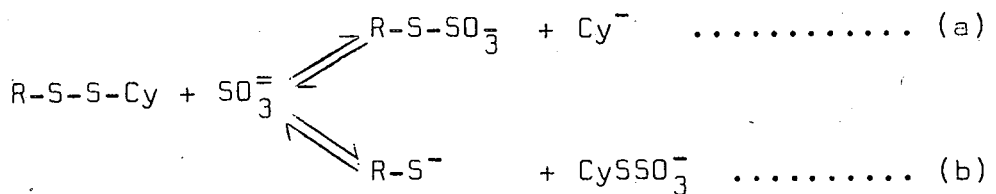


volg dat:-

$$\frac{[\text{R-S-SO}_3^-]}{[\text{R}'\text{-S-SO}_3^-]} = \frac{[\text{R-S-SO}_3^-]}{[\text{R-S-HgCH}_3]}$$

Al die onsimmetriese disulfiede wat bestudeer is, het ³⁵S-gemerkte sisteïen of sisteamien bevat en volgens bogenoemde vergelyking kan die voorkeur of affiniteit van sulfietione vir die twee swaelatome dus direk bepaal word uit die relatiewe verhouding van die twee radioaktiewe splitsingsprodukte nl. $\text{R-S}^*\text{-SO}_3^-$ en $\text{R-S}^*\text{-HgCH}_3$. In die gevalle waar die sulfietione geen voorkeur vir 'n spesifieke swaelatoom het nie, sal hierdie verhouding 'n waarde van 1.0 hê; waardes groter of kleiner as 1.0, dui daarop dat sulfiet 'n groter affiniteit vir een van die swaelatome van die onsimmetriese disulfied het.

Dit is noodsaaklik om daarop te wys dat Schöberl³⁰⁵ verbinding XIV met sulfietione behandel het, en gevind het dat slegs sisteëen en S-sulfomerkapto-asynsuur en geen S-sulfosisteëen en/of tioglikolsuur gevorm is nie. Dit impliseer 'n oneindige voorkeur van sulfiet vir die swaelatoom aan die karboksümetielgroep van die disulfied, in teenstelling met die voorkeur van 1.6 wat in tabel II aangegee word. Hierdie anomalie is waarskynlik te wyte aan die feit dat Schöberl sy sulfitoliese in die teenwoordigheid van fosfowolframsuur uitgevoer het, waardeur die ewewig van die omkeerbare reaksies beïnvloed kan word:-



Fosfowolframsuur reageer net met CyS^- en nie met die ander produkte in bogenoemde reaksie nie en dus word die ewewig in vergelyking (a) totaal na regs verplaas. Reaksie (b) bly nog altyd omkeerbaar, en hierdie ewewig word gevolglik na links verplaas. Dié versteuring beïnvloed daardeur die hele sisteem en dit verklaar waarom Schöberl slegs R-S-SO_3^- en die kompleks tussen CyS^- en fosfowolframsuur in die reaksiemengsel gevind het. Omdat CH_3HgI vinnig met sisteëen sowel as tioglikolsuur reageer, is sulke komplikasies nie in hierdie ondersoek ondervind nie.

Daar het natuurlik ook die moontlikheid bestaan dat CH_3HgI met verskillende snelhede met die verskillende tiole kan reageer, sodat dit die ewewigte en gevolglik die voorkeure kan beïnvloed, net soos Schöberl ondervind het. Die feit dat N-etiëlmaleïenimied egter in die gevalle waar dit CH_3HgI as tiolreagens vervang het, (tabel II) nog steeds dieselfde resultate gegee het, toon dat CH_3HgI en N-etiëlmaleïenimied nie die ewewigte beïnvloed nie en dat die verhouding $\text{RSSO}_3^-/\text{R}'\text{SSO}_3^-$ 'n direkte maatstaf is van die affiniteit van sulfiet vir die twee swaelatome van die onsimmetriese disulfied.

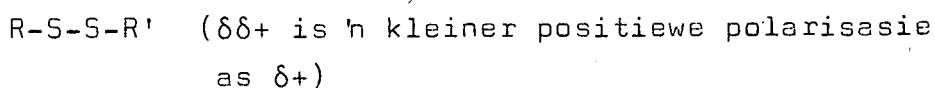
Die resultate verkry van die sulfitolise van onsimmetriese disulfiede, is in tabelle II en III aangegee.

Dit blyk dat daar slegs drie onsimmetriese disulfiede is (nl. verbindings I, II en III), waar die verhouding $RSSO_3^-/R'SSO_3^-$ naby genoeg aan 1.0 lê om te kan aanvaar dat sulfiet geen voorkeur vir enige van die twee swaelatome van die disulfied het nie. By al die ander disulfiede toon die sulfietione 'n groter affiniteit vir een van die swaelatome; dit wissel van 'n geringe voorkeur in verbinding XIV, tot 'n voorkeur wat feitlik uitsluitlik net op een swaelatoom gerig is in verbindings XII en XVI.

Daar is vier faktore wat moontlik hierdie voorkeur van sulfiet vir 'n sekere swaelatoom kan veroorsaak en uit die literatuur blyk dit dat elkeen van hierdie faktore 'n skool van ondersteuners het. Hierdie faktore het telkens ter sprake gekom in die inleidende bespreking, en sal duidelikheidshalwe weer kortliks aangestip word:-

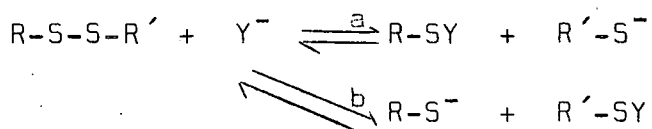
Dit is moontlik dat steriese faktore^{108,109} die aanval van die sulfiet kan beïnvloed, want nukleofiele verplasing van swael vind deur 'n rugkant-aanval plaas sodat intredende en uittredende groepe in die oorgangstadium in 'n reguit lyn lê. Indien die ruimtelike rangskikking van groepe om die twee swaelatome verskil, kan verwag word dat die gemak van toegang van sulfietione tot die twee swaelatome sal verskil en dus mag 'n preferensiële substitusie plaasvind. (n Volledige bespreking van die invloed van steriese faktore by sulfitolises word op bladsy 30 gevind.)

Daar is ook beweer^{137,257} dat die polarisasie van die disulfiedbinding (as gevolg van elektronverplasingsinvloede) die reaktiwiteit van die swaelatome kan beïnvloed. In die disulfied $R-S-S-R'$ (R' is sterker elektrononttrekkend as R) sal die twee swaelatome na bewering as volg gepolariseer wees:-



Dit is bekend²²⁰ dat elektrofiele aanval by so 'n onsimmetriese disulfied plaasvind op die swaelatoom wat die verste van die elektrononttrekkende groep R' lê, en na analogie hiervan is verwag dat 'n nukleofiele reagens soos sulfiet dus swaelatoom $S^{\delta+}$ behoort aan te val. Sekere werkers²⁷⁰ het gevind dat presies die teenoorgestelde plaasvind en dit het gelei tot die derde beskouing nl. dat nukleofiele

reagense die swaelatoom die verste vanaf die sterker elektrononttrekkende groep aanval, sodat die meer stabiele merkaptied uit die onsimmetriese disulfied verplaas word. Die volgende moontlike ewewigte bestaan in die reaksie van 'n nukleofiele reagens Y^- met 'n onsimmetriese disulfied:-



Bogenoemde werkers²⁷⁰ het beweer dat $R'S^-$ 'n stabielere anioon is as RS^- , (omdat die pK-waarde van die tiolgroep van $R'SH$ laer is as dié van RSH), met die gevolg dat die ewewig by vergelyking (a) na regs en dié by vergelyking (b) na links verplaas sal word. Dit verklaar waarom gevind is dat die merkaptied met die laer pK-waarde uit die onsimmetriese disulfied verplaas word deur nukleofiele reagense.

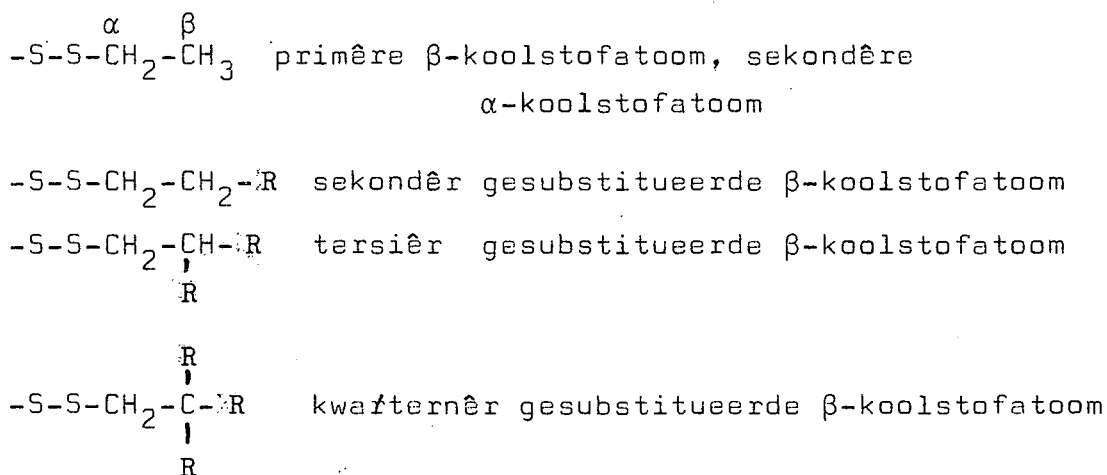
Vierdens is dit ook moontlik dat coulombiese kragte die reaktiwiteit kan beïnvloed⁵⁸. Die rol wat hierdie kragte by sulfitolises kan speel, is breedvoerig bespreek in hoofstuk V, waaruit geblyk het dat negatief gelaaiede groepe die sulfietione mag afstoot terwyl positief gelaaiede groepe dit kan aantrek. Die moontlikheid bestaan dus dat die sulfiet by onsimmetriese disulfiede waar verskillend gelaaiede groepe aan die twee swaelatome gebind is, 'n groter affiniteit vir een van die swaelatome mag toon.

Die vier hipoteses wat hierbo genoem is, sal vervolgens getoets word met die inligting wat eksperimenteel verkry is.

Wat die polariserende invloed van groepe op die twee swaelatome van die disulfied betref, moet onthou word dat hierdie invloed progressief afneem hoe verder die groep van die swaelatoom geleë is. Hierdie effek behoort dus slegs van betekenis te wees in die gevalle waar die groep wat dit veroorsaak in 'n α -posisie met betrekking tot die swaelatoom geleë is. In verbindings I, II en III is die groepe verantwoordelik vir die asimmetrie van die disulfied, geleë op die β -koolstofatoom. Ten spyte van die feit dat die elektronverplasingseffekte van hierdie groepe drasties verskil, wys die resultate dat die sulfiet sonder enige voorkeur met die individuele swaelatome reageer. Dus kan beweer word dat substituentte op β -koolstofatome te ver van

die swaelatoom verwyder is om enige betekenisvolle polarisasie daarvan te kan veroorsaak. Verbindings IV, V en VI verskil slegs wat betref die substituent op die β -koolstofatoom van die een helfte. Die verhouding $RSSO_3^-/CySSO_3^-$ ($Cy = HOOC-CH(NH_2)-CH_2-$) is in al drie hierdie gevalle ongeveer dieselfde, wat in ooreenstemming is met die gevolgtrekking wat hierbo gemaak is. In verbinding XVI is die een swaelatoom wel direk aan 'n sterk elektrononttrekkende groep gebind, terwyl die ander deur 'n metileengroep geïsoleer word van groepe wat dit kan beïnvloed. Die swaelatoom wat aan die elektrononttrekkende 3-karboksi-4-nitrofenielgroep gebind is, sal meer positief gepolariseer wees as die ander swaelatoom en gevolglik behoort sulfiet 'n groter affiniteit vir eersgenoemde swaelatoom te toon. Dit is egter nie die geval nie en in werklikheid vind aanval alleenlik op die ander swaelatoom plaas. Die resultaat verkry van verbinding XIII is ook in ooreenstemming met bogenoemde waarnemings en dit blyk dus dat enige invloed van polarisasie totaal opgehef word deur ander faktore.

Ten einde die bespreking wat volg, te vergemaklik en verwarring te voorkom, word enkele terme α wat β gebruik word, eers gedefinieer. In die disulfied $-S-S-CH_2-CH_3$ sal substitusie van die waterstofatome van die β -koolstofatoom deur ander groepe lei tot 'n sekondêr, tersiêr of kwatêrnêr gesubstitueerde β -koolstofatoom:-



Word verbindings IV tot IX beskou, blyk dit dat daar beslis 'n begunstigde aanval van sulfietione op een van die swaelatome van die disulfied plaasvind. In al hierdie verbindings is die verhouding van $RSSO_3^-/R'SSO_3^- \approx 2.0$.

Hierdie verbindings bevat 'n primêre β -koolstofatoom (verbinding IV) of sekondêre β -koolstofatoom (verbindings V-IX) aan die een kant en almal bevat 'n tersiêre β -koolstofatoom aan die ander kant. By al hierdie disulfiede toon die sulfietione 'n groter affiniteit vir die swaelatoom aan die kant van die primêre of sekondêre β -koolstofatoom, as vir die swael aan die kant van die tersiêre β -koolstofatoom. In die geval waar die β -koolstofatoom aan die een kant van tersiêr (verbinding V) na kwarternêr (verbinding X) verander word, neem die voorkeur van sulfiet vir die swaelatoom aan die kant van die sekondêre β -koolstofatoom drasties toe.

Dit is duidelik dat substitusie op 'n β -koolstofatoom die reaksie van sulfietione met die disulfiedbinding beïnvloed. Hierdie effek is direk verwant aan die graad van substitusie, maar onafhanklik van die geaardheid van die substituent. Die implikasie hiervan is dat polarisasie van die disulfiedbinding deur groepe op β -koolstofatome 'n onbeduidende rol speel en dat die reaksie met sulfiet grootliks beheer word deur stereochemiese faktore.

Dit is bekend dat simmetriese disulfiede wat tersiêre of kwarternêre α -koolstofatome besit, stabiel is teenoor nukleofiele reagense^{254,289,309}, en verder is ook bewys dat kwarternêre substitusie groter steriese verhinderings as tersiêre substitusie veroorsaak. Hierdie bevindings is weer eens bevestig deur die resultate verkry van verbindings XI en XII. In verbinding XIV is die steriese beskermingseffekte van die twee groepe wat aan die twee swaelatome gebind is, feitlik dieselfde. Word 'n waterstofatoom van die een α -koolstofatoom verplaas deur 'n metielgroep (verbinding XV) sodat dit van 'n sekondêre na tersiêr-gesubstitueerde koolstofatoom verander, dan verlaag die affiniteit van die sulfiet vir daardie spesifieke swaelatoom drasties. Sover bekend, is hierdie die eerste studie waarin bewys word dat substitusie op β -koolstofatome ook 'n steriese beskermingseffek op die swaelatome van disulfiede het. Hierdie effek is natuurlik heelwat groter by α - as by β -koolstofatome omdat laasgenoemde verder van die swaelatoom lê, en word mooi geïllustreer deur die resultate van verbindings IX (β -tersiêr) en XI (α -tersiêr) en verbindings X (β -kwarternêr) en XII (α -kwarternêr).

Parker en Kharasch²⁷⁰ het in die geval van $2,4-(NO_2)_2C_6H_3-S-S-R$ ($R = -CH_2-CH_3$ of $-CH_2-CH_2OH$) gevind dat nukleofiele aanval feitlik uitsluitlik op die swaelatoom ($-S-R$) plaasvind. Dit bring ons by die derde faktor wat moontlik die nukleofiele splitsing van disulfiedbindings kan beïnvloed, nl: die bewering van bogenoemde skrywers dat die meer stabiele merkaptiedanioon (met die laer pK-waarde) uit die disulfied verplaas sal word. Soos voorheen vermeld, bestaan daar nog heelwat onsekerheid oor die toekenning van spesifieke pK-waardes aan die tiolgroepe van verbindings wat ook amino- en karboksiesuurgroepe bevat. Om onnodige spekulasies te vermy, is slegs die onsimmetriese disulfiede waarvan die pK-waardes van die ooreenkomstige merkaptiede^{76,138,236} met 'n redelike mate van sekerheid bekend is, gekies om die bewering van Parker en Kharasch te toets. Die gegewens word in tabel XI gevind.

TABEL XI

R-S-S-R'	pK		RSSO ₃ ⁻ /R'SSO ₃ ⁻
	RSH	R'SH	
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -COOH	8.4	10.1	1.0
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH ₂ -OH	8.4	9.6	1.0
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -COOH	8.4	10.1	2.3
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -S-S-CH ₂ -CH(COOH)-NH-CO-CH ₃	8.4	9.5	2.0

Indien die Amerikaanse werkers se bewering korrek sou wees, behoort sisteemien in al die verbindings in tabel XI as die meer stabiele merkaptied verplaas te word, met die gevolg dat sulfiet 'n groter affiniteit vir die ander swaelatoom moet toon. Die verhouding $RSSO_3^-/R'SSO_3^-$ behoort dus in al bogenoemde gevalle kleiner as 1.0 te wees. Dit is nie die geval nie. Die bewering dat 'n nukleofiele reagens die meer stabiele merkaptied uit 'n onsimmetriese disulfied verplaas, geld dus nie vir bogenoemde disulfiede nie.

Alhoewel die aanname van Parker en Kharasch wel van toepassing mag wees op verbinding XVI, waar die pK-waarde van die tiolgroepe van 3-karboksi-4-nitrotiofenol¹⁰² waarskynlik laer as 5.0 is, terwyl dié van sisteemien hoër as 8.0 is, blyk uit ons bevindings dat hierdie hipotese

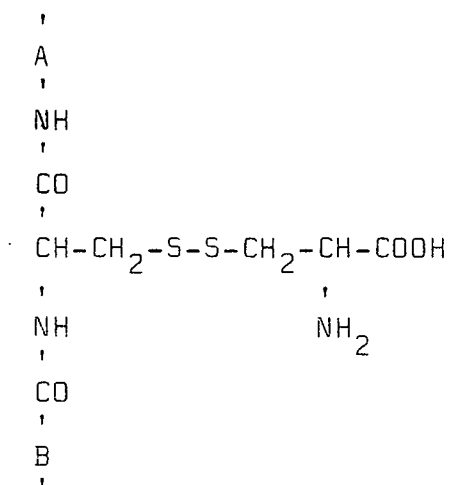
nie konsekwent geld vir al die disulfiede wat ondersoek is nie. In teenstelling hiermee word al die resultate bevredigend verklaar deur die invloed van stereochemiese faktore, en hierdie effek is skynbaar so sterk dat dit enige moontlike invloed wat die relatiewe stabiliteite van die merkaptiedione op die voorkeur van sulfiet vir die swaelatome mag uitoefen, totaal ophef. Hoewel Parker en Kharasch nie die rol wat steriese verhinderings by hul reaksies kan speel, in ag geneem het nie, is dit nogtans moontlik om baie van hul bevindings hierdeur te verklaar, soos bv. die feit dat die aanval van verskeie nukleofiele reagentiese uitsluitlik op die swaelatoom (-S-R) van die onsimmetriese disulfied Ar-S-S-R plaasvind. Die aromatiese koolstofatoom kan as 'n kwatertêr-ge-substitueerde α -koolstofatoom beskou word, terwyl die ander swaelatoom aan 'n sekondêre α -koolstofatoom gebind is, en volgens ons bevindings behoort Ar-S- dus in 'n groter mate steriese beskerming te geniet as -S-R.

Die vierde faktor wat moontlik die reaktiwiteit van onsimmetriese disulfiede kan beïnvloed, is coulombiese kragte. Daar is beweer⁵⁸ dat negatief gelaaiete sulfietione vinnig met positief gelaaiete molekules soos sistamien en stadig met negatief gelaaiete ditiodipropioonsuur reageer, omdat teenoorgestelde gelaaiete molekules mekaar aantrek en identiese gelaaiete molekules mekaar afstoot. By al die onsimmetriese disulfiede wat bestudeer is, is die twee swaelatome gebind aan groepe wat verskillende ladings dra (in die pH-gebiede waarby die ondersoek uitgevoer is) en hoewel die sulfitolises nie onder omkeerbare toestande ondersoek is nie (en dus nie direk met kinetiese reaksie-studies vergelyk kan word nie), bestaan daar nogtans 'n moontlikheid dat die aanval van sulfiet deur coulombiese kragte beïnvloed kan word. Die negatief gelaaiete sulfietione moet dus deurgaans 'n groter affiniteit toon vir die swaelatoom wat aan die meer positief gelaaiete fragment gebind is, en indien so 'n effek wel 'n noemenswaardige invloed op die voorkeure het, behoort die resultate in tabel II dit te illustreer. Hiervolgens behoort verbindings I, II en III almal $RSSO_3^-/R'SSO_3^-$ -waardes groter as 1.0 te gee. Dit is egter nie die geval nie. In verbindings V en VI is groep R' in albei gevalle dieselfde, terwyl groep R in eersgenoemde geval positief en in laasgenoemde geval negatief gelaai is. Gevolglik behoort die voorkeure groot verskille

te toon, maar dit is nie die geval nie. Verder is dit ook nie moontlik om die resultate verkry vanaf verbindings XIV en XV met behulp van die invloed van coulombiese kragte te verklaar nie, en dit is trouens onmoontlik om enige verband tussen coulombiese effekte en ons resultate te vind. Skrywer wil dan ook die bewering maak dat die rigtende effek by nukleofiele aanval deur sulfietione op onsimmetriese disulfiede so sterk beïnvloed word deur stereochemiese faktore dat enige ander effek, indien dit wel voorkom, feitlik geen betekenis het nie.

Hierdie steriese verhinderings word nie net by onsimmetriese disulfiede van lae molekulêre gewig gevind nie, maar ook by die onsimmetriese disulfiede tussen sisteïene en proteïene, soos die resultate in tabel III duidelik toon.

Bogenoemde disulfiede sien almal soos volg daar uit:



Alhoewel beide β -koolstofatome tersiër gesubstitueer is en gevolglik verwag is dat sulfiet geen voorkeur vir enige swaelatoom sal toon nie, het dit uit die eksperimentele bevindings geblyk dat die sulfietione 'n voorkeur vir die „sisteïene” swaelatoom van die natuurlike proteïene toon. Hierdie voorkeur ($CySS_3^-/Prot.SSO_3^-$) varieer van 2.0 in die geval van hemoglobien, tot 9.0 in die geval van albumien en laktalbumien. Na denaturering deur ureum toon die sulfiet geen voorkeur vir 'n spesifieke swaelatoom nie en is die waarde van $CySSO_3^-/Prot.SSO_3^-$ in al die gevalle 1.0. Die resultate verkry by die natuurlike proteïene toon dat die toegang van die sulfietione tot die swaelatoom van die „proteïen-tiolgroep” in 'n aansienlike mate verhinder word. Na denaturering word geen verhinderings ondervind nie, wat beteken dat die beskerming wat by die natuurlike proteïene ondervind is, te wyte was aan steriese faktore, wat 'n funksie

is van die sekondêre en tersiêre struktuur van die proteïenmolekule. (Dit is bekend²²⁶ dat 'n gedensatureerde proteïen 'n ongeordende (willekeurige klos) konfigurasie het, in teenstelling met die geordende vorm van die natuurlike proteïen). Die feit dat ons gevind het dat verskillende natuurlike proteïene verskille in die voorkeur toon, word toegeskryf aan verskillende grade van steriese verhinderings wat by die proteïen-S-S-Cy-binding verleen word.

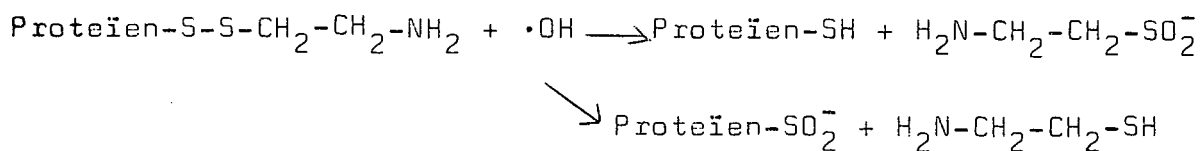
Die inligting wat uit hierdie ondersoek verkry is, kan aangewend word om die verskille in reaktiwiteit van die disulfiedbindings van proteïene te verklaar. Steriese verhinderings as gevolg van die geordende struktuur van natuurlike insulien* verhoed bv. die toegang van sulfietione tot die disulfiedbinding wat reste 6 en 11 van die A-ketting verbind, terwyl die disulfiedgroep van die analoë oksitoksienring wel onder soortgelyke kondisies reageer. Aangesien aangevoer word dat geordende strukture slegs stabiel is as die polipeptied meer as 8-15 aminosuurreste bevat²⁹⁹, kan aanvaar word dat die oksitoksienring (molekulêre gewig = 980) in 'n ongeordende vorm bestaan en dus toeganklik is vir aanval deur sulfietione. Bogenoemde hipotese word ondersteun deur die feit dat al drie die disulfiedbindings van insulien met sulfiet reageer na denaturering van die proteïen²⁴⁸.

Net so kan die feit⁵⁵ dat geeneen van die vier intrakettingdisulfiedbindings van natuurlike lisosiem of ribonuklease met sulfietione reageer nie, terwyl twee van pepsien se drie, en vyf van tripsien se ses disulfiede wel reageer, verklaar word deurdat verskillende grade van steriese verhinderings by die onderskeie disulfiedbindings ondervind word. Sodra die geordende struktuur van die natuurlike proteïen vernietig word deur denaturering, word al die disulfiedbindings toeganklik vir aanval deur sulfiet en bestaan daar geen verskille in die reaktiwiteit nie.

'n Verdere aspek wat vermelding verdien, is die bevinding dat tirole in vivo beskerming kan verleen teen X- en γ -strale, as gevolg van die vorming van onsimmetriese

* Dit word algemeen aanvaar dat sulfietione slegs die twee interkettingdisulfiedbindings van insulien splits, terwyl die intrakettingdisulfiedbinding wat reste 6 en 11 van die A-ketting verbind, stabiel is en nie reageer tensy die proteïen gedensatureer word nie^{59,216,217,248}.

disulfiede met die serumproteïene. Eldjarn en Pihl⁹⁹ het beweer dat die proteïenmolekule as volg teen die effekte van bestraling beskerm word:-

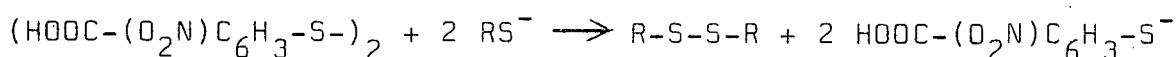


Hulle het aangevoer dat daar 'n gelyke kans bestaan dat aanval op enige van die twee swaelatome kan plaasvind, met die gevolg dat die aantal proteïen-tiolgroepe wat deur straling vernietig sal word, met 'n faktor van twee sal verminder in die geval waar die tiolgroep beskerm is deur die vorming van 'n onsimmetriese disulfied. Uit die inleidende bespreking blyk dit dat vry radikaalreaksies ook deur steriese faktore beïnvloed word en aangesien ons gevind het dat nukleofiele aanval by soortgelyke onsimmetriese disulfiede as dié wat deur Eldjarn en Pihl ondersoek is, by voorkeur op die „sisteïen“-swaelatoom plaasvind, behoort die „proteïen“-swaelatoom tot nog 'n groter mate teen die effekte van ioniserende straling beskerm te wees as wat bogenoemde werkers vermoed het.

=====

XIV. TIOL-DISULFIEDUITRUILING EN DIE KWANTITATIEWE
BEPALING VAN TIOLE DEUR 5,5'-DITIOBIS-(2-NITRO-
BENSOËSUUR)

In die inleidende bespreking is gewys op die gebruik van sekere disulfiede as reagense vir die kwantitatiewe bepaling van tiole. Die aantreklikheid van hierdie bepalingmetodes lê veral daarin dat dit maklik uitvoerbaar is en nie duur reagense of apparaat vereis nie. Een van dié metodes wat die afgelope tyd geweldig veld gewen het, is deur Ellman¹⁰² ontwikkel. Dit word daaglik in hierdie laboratorium gebruik en berus op die feit dat 5,5'-ditiobis-(2-nitrobensoësuur) (DTN) deur middel van 'n tiol-disulfieduitruiling met tiole reageer om 3-karboksi-4-nitrotiofenol (CNT) te vorm:-



Omdat die absorpsiespektrum van CNT-ione, wat 'n maksimum by 412 m μ toon, heeltemal verskil van dié van die uitgangstof DTN met absorpsiemaksimum by 340 m μ , en aangesien Ellman bewys het dat hierdie tiol-disulfieduitruiling kwantitatief verloop vir die tiole wat hy ondersoek het, kan die konsentrasie van die oorspronklike tiol vasgestel word deur die kolorimetriese bepaling van die konsentrasie van die CNT-ione.

Dit is bekend dat onsimmetriese disulfiede in feitlik alle reaksies tussen tiole en disulfiede gevorm word en die moontlikheid het dus bestaan dat dit ook by die DTN-bepalingmetode teenwoordig mag wees. Indien so 'n onsimmetriese disulfied wel gevorm sou word, en die absorpsiespektrum daarvan baie van dié van DTN sou verskil, of as die disulfied weens sy asimmetrie in ander reaksies behalwe tiol-disulfieduitruiling betrokke sou raak, kon dit die akkuraatheid van die metode nadelig beïnvloed en sy analitiese waarde verlaag. Hoewel die DTN-metode algemeen gebruik word, is hierdie aspekte nog nie voorheen bestudeer nie, gevolglik is 'n deel van hierdie ondersoek daaraan gewy.

In die eksperimentele gedeelte is bewys dat onsimmetriese disulfiede wel in aansienlike hoeveelhede in die reaksie tussen DTN en glutatioon of sisteëne gevorm word (figuur IX). Verder is aangetoon dat die onsimmetriese disulfied feitlik dieselfde absorpsiespektrum as DTN het (figuur XI), en aangesien bewys is dat die DTN-konsentrasie nie die kolorimetriese bepaling van die CNT-ione beïnvloed nie (tabel IV), sal die onsimmetriese disulfied ook nie by

die bepalingmetode inmeng nie. Die hoeveelheid CNT-ione wat gevorm is en kolorimetries bepaal word, is dus 'n direkte maatstaf van die hoeveelheid tiol wat oorspronklik teenwoordig was.

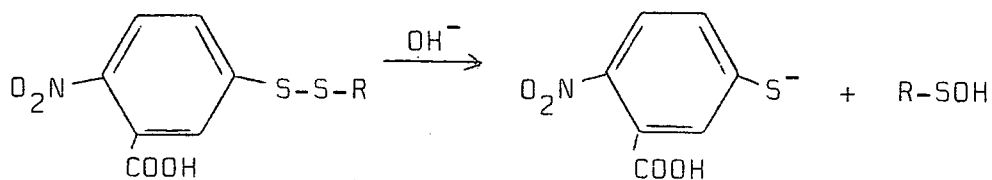
In verdere studies is gevind dat die gevormde onsimmetriese disulfied onder sekere toestande nie baie stabiel is nie en in ander reaksies behalwe tiol-disulfied-uitruiling betrokke raak. Dit is bekend¹²⁰ dat ultravioletlig disulfiedbindings homolities kan splits en om moontlike inmenging hierdeur uit te skakel, is die eksperimente in 'n donkerkamer gedoen met wolframlampe as die enigste bron van lig. Verder kan metaalsoute³⁵⁵ die oksidasie van CNT-ione versnel; om dit te verhoed is die dinatriumsout van etileendiamientetra-asynsuur gebruik as sekwestreerreagens saam met DTN. Ten spyte van bogenoemde voorsorgmaatreëls het die onsimmetriese disulfied nog steeds ontbind. Na 'n verdere ondersoek is vasgestel dat die alkaliniteit van die oplossing 'n groot invloed op die stabiliteit van die onsimmetriese disulfied het.

Uit die resultate (tabel V) blyk dat die onsimmetriese disulfied tussen CNT en sisteïen of glutatïon labiel is en deur alkali afgebreek word om die ooreenkomstige alifatiese sulfien- en sulfoonsure te vorm. Om moontlike komplikasies deur alkaliese vernietiging van die disulfiedbinding te vermy, moet die DTN-bepalingmetode dus by die laagste moontlike pH uitgevoer word. Dit is egter ook bekend dat tiol-disulfieduitruilingsreaksies deur die merkaptiedioon (RS^-) en nie deur die tiol (RSH) verloop nie²⁸, en gevolglik moet die bepaling uitgevoer word by 'n pH wat hoog genoeg is om dissosiasie van die tiolgroepe wat bepaal word, te verseker. Verder moet die pH ook hoog genoeg wees om dissosiasie van die gevormde CNT te bewerkstellig, want Ellman¹⁰² het aangetoon dat slegs die gedissosieerde vorm van CNT by 412 m μ absorbeer. (Die spektrum van ongedissosieerde CNT kom ooreen met dié van DTN). In sy oorspronklike publikasie het Ellman¹⁰¹ aanbeveel dat die reaksie by pH 8.0 uitgevoer word. Die pK-waarde van die tiolgroep van 4-nitrofenielmerkaptan word aangegee as 5.1. Hierteenoor bevat die fenielgroep van CNT twee sterk elektrofiele groepe en aangesien dit bekend is dat die dissosiasie van groepe aan 'n fenielgroep bevorder word deur elektrofiele substituentte, behoort die pK-waarde van die tiolgroep van CNT nog laer as 5.1 te wees. Gevolglik sal feitlik al die CNT gedissosieer wees by pH 8.0, sodat die

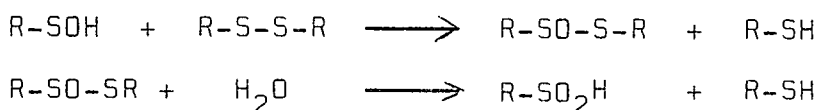
bepaling by 412 m μ kwantitatief sal wees. Ons het gevind dat hidrolise van die disulfiede verder vertraag kan word, sonder afbreek aan die doeltreffendheid van die metode, deur die pH van die reaksiemengsel te verlaag tot 7.4.

Dit was in hierdie stadium nodig om die meganisme waarvolgens die onsimmetriese disulfied ontbind word, te ondersoek. Uit die literatuuroorsig wat in die inleidende bespreking gegee is, blyk dat die disulfiedbinding oor die algemeen redelik stabiel is teenoor alkaliese hidrolise, omdat die hidroksielioon nie 'n baie sterk tiofiele reagens is nie. Die besondere labiliteit wat by die CNT-bevattende onsimmetriese disulfied ondervind is, is dus nie 'n algemene kenmerk van disulfiedbindings nie. So is gevind dat die onsimmetriese disulfied tussen DTN en sisteïen of glutatioon grotendeels ontbind is om die ooreenkomstige alifatiese sulfien- en sulfoonsure te vorm, nadat dit vir 30 minute by pH 11.5 gestaan het (tabel V). Hierteenoor het kontrole-monsters sisteïen en glutatioondisulfied (GSSG) geen ontbinding onder soortgelyke kondisies getoon nie. Die labiliteit van bogenoemde disulfied kan moontlik toegeskryf word aan die asimmetrie daarvan. Eldjarn en Pihl⁹⁹ het bv. aangevoer dat onsimmetriese disulfiede termodinamies nie so stabiel is as simmetriese disulfiede nie. Die 3-karboksi-4-nitrofeniel-groep van die disulfied kan die labiliteit verder verhoog, want dit is bewys dat alhoewel difenioldisulfied^{281,303} stabiel is teenoor alkali, die disulfiedbinding drasties verswak word deur HOOC- of O₂N-groepe in die benseenring te substitueer^{270,313,329}.

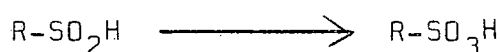
Aangesien CNT en die alifatiese sulfien- en sulfoonsure by die alkaliese hidrolise van die onsimmetriese disulfied gevorm word, lyk dit asof daar 'n direkte nukleofiele aanval van OH⁻ op die disulfiedbinding plaasvind, sodat die reaksie waarskynlik as volg verloop:-



Volgens huidige teorieë ondergaan 'n sulfeensuur (wat uiters onstabiel is en in slegs twee gevalle, sover bekend⁴¹, geïsoleer kon word) dismutasie om die ooreenkomstige sulfiensuur en tiol te vorm:-



Die sulfoonsuur word moontlik gevorm deur die stadige oksidasie van die sulfiensuur:-



h Dismutasie van die sulfiensuur is ook moontlik:-



Noudat aangetoon is teen watter faktore gewaak moet word wanneer die DTN-bepalingsmetode gebruik word, en ons die reaksiekondisies dienooreenkomstig verander het in h poging om die akkuraatheid te verhoog, is hierdie metode gebruik om die tiolinhoud van h onoplosbare proteïen (keratien) te bepaal. Voorlopige eksperimente het egter getoon dat dit nie moontlik is om die tiolgroepe van ongehidroliseerde keratien met DTN te bepaal nie, want lae onreproduseerbare resultate is telkens verkry. Dit is bekend dat sekere van die tiolgroepe van natuurlike proteïene ontoeganklik is vir die reagens as gevolg van die ruimtelike rangskikking van die proteïenmolekule. Hierdie ontoeganklike of afgeskermdede groepe kan eers bepaal word nadat die geordende proteïenstruktuur vernietig is. Hidrolise van die peptiedkettings is waarskynlik die eenvoudigste en mees algemene metode waardeur die proteïen afgebreek word na kleiner fragmente. Wanneer h proteïen egter gehidroliseer word, word die tiolgroepe geleidelik vernietig²⁶⁶ en dus moet die hidrolisetyd so kort moontlik gehou word om die vernietiging tot h minimum te beperk. Louw²³³ het bv. die hidrolisetyd van 8 tot 4 uur verminder en gevind dat dit hoër waardes vir die tiolinhoud van wol gee, soos bepaal deur die fosfowolframmetode. Zahn³⁸⁷ het dit nog verder verminder tot 2 uur en die hidrolisaat dan titreer met fenielmerkurihidroksied in die teenwoordigheid van guanidien met nitroprussied-indikator. Ook hy het gevind dat verkorte hidrolisetye h toename in die tiolinhoud van wol gee.

Hoewel te lang hidrolisetye vernietiging van die tiolgroepe meebring, bestaan daar ook die gevaar dat te kort hidrolisetye te lae waardes kan gee, omdat al die tiolgroepe dan nog nie toeganklik mag wees vir die reagens nie. Gevolglik moet daar sekere optimum hidrolisetye bestaan vir die bepaling van tiolgroepe in proteïene. Wanneer wol gehidroliseer word onder standaard kondisies, neem dit ongeveer twee uur voordat al die proteïen opgelos het, en dit word algemeen aanvaar dat dit die minimum

hidrolisetyd is wat gebruik kan word. Ons het egter gevind dat die hidrolisetyd nog verder verkort kan word deur die hidrolisaat meganies te roer, en vervolgens is 'n ondersoek ingestel na die hidrolisetye wat die optimum tiolinhoud vir meganies-geroerde keratienhidrolisate gee, soos bepaal met die DTN-metode.

Uit die resultate blyk dat 'n lae waarde by die 30 minute hidrolisaat verkry is (tabel VI). Dit kan verklaar word deur die feit dat al die wol nog nie opgelos het na 'n hidrolise van 30 minute onder die gegewe toestande nie. Hidrolisetye van 45 tot 90 minute gee die maksimum waarde vir die tiolinhoud. Wanneer die wol langer as 90 minute gehidroliseer word, is gevind dat die hidrolisaat 'n pers of bruin kleur begin ontwikkel; dit gaan gepaard met 'n afname in die tiolinhoud van die wol. Die optimum hidrolisetyd vir die reaksietoestande hierbo beskryf, lê dus in die gebied 45-90 minute. Word die oplossing glad nie geroer nie, los die wol baie stadiger op en is die minimum tydperk vir hidrolise twee uur, soos deur Zahn aanbeveel is.

Hoewel die vernietiging van tiolgroepe gedurende hidrolise van proteïene 'n algemeen erkende feit is, bestaan daar nog nie duidelikheid oor die faktore wat dit teweeg bring nie. Dit wil egter voorkom asof die aanname van Olcott en Fraenkel-Conrat²⁶⁶ die mees waarskynlike is. Hulle het beweer dat pirodruiwesuur, wat afkomstig is van die ontbinding van serien gedurende die hidrolise, die hoof-oorsaak is vir die vernietiging van sisteïene. Dit is bekend dat pirodruiwesuur met triptofaan reageer om bruin of swart oplossings of presipitate (wat humien genoem word) te gee. Aangesien die geroerde hidrolisate eers na 90 minute gekleurd raak, is dit moontlik dat daar voor die tyd nog nie genoeg pirodruiwesuur gevorm het om enige ontbinding te veroorsaak nie. Hierdie hipotese is in ooreenstemming met die feit dat die sisteïeninhoud van die gehidroliseerde wol konstant bly tot 'n hidrolisetyd van 90 minute, waarna dit begin afneem.

Nadat die optimum kondisies vir die meganies-geroerde keratienhidrolises vasgestel is, was dit ten slotte nodig om die resultate verkry met die DTN-metode te vergelyk met 'n kontrolebepaling. (Vir die kontrole is besluit op 'n argentometriese titrasie van die tiolgroepe.) Die tiolinhoud van wolhidrolisate wat vir 45 minute meganies geroer is, is met bogenoemde twee metodes bepaal. Uit die resultate, wat in tabel VII aangegee word, blyk dat

die DTN-bepalingsmetode baie goed vergelyk met die argen-
tometriese kontrolemetode, vir 'n aantal wolmonsters wat
ondersoek is. Die resultate toon dat die DTN-bepalings-
metode nie alleen in die geval van 'n normale onbehandelde
wol gebruik kan word nie, maar ook suksesvol aangewend
kan word vir bepaling in proteïene wat verhoogde tiolinhoude
het as gevolg van reduksies of bestraling met ultravioletlig.
Afgesien van die feit dat die DTN-metode dus akkuraat is,
het dit ook die voordeel dat dit baie eenvoudig is, en dat
geen standaardoplossing benodig word nadat die kalibrasie-
lyn eers opgestel is nie. (Vroeër is reeds aangetoon dat
die DTN-konsentrasie geen invloed op die kolorimetriese
bepaling van die CNT-ione het nie (tabel IV).)

XV. DIE REDUKSIE VAN SISTIEN DEUR HIPOFOSFIETIONE(i) Die lig-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reduksie-reaksie:

Soos reeds voorheen genoem, is in hierdie laboratorium bewys dat hipofosforigsuur en sy soute in staat is om die disulfiedbindings van sistien, peptiede en proteïene onder sekere omstandighede³⁴⁹⁻³⁵¹ te reduseer. Hierdie reduksie verloop nie vanself nie en moet geïnduseer word deur verhitting of bestraling met ultravioletlig.

In die teenswoordige ondersoek is gevind dat die reduksie van sistien deur hipofosfietione geïnisieer word deur ultravioletlig vanaf die Phillips- en Hanovia-lampe (figure XV en XVI). In die gevalle waar CCl_4 -filters gebruik is, is geen reduksie verkry nie, wat beteken dat al die energie wat nodig is vir induksie, deur hierdie filter uitgesny word, en dus 'n golflengte korter as ca. 262 m μ moet besit. Die induksie van die sistien/hipofosfiet-reduksie word dus deur lig van die volgende golflengtes veroorsaak:

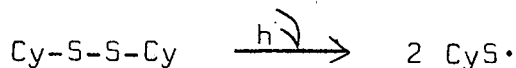
Phillips-lamp:

254 m μ

Hanovia-lamp:

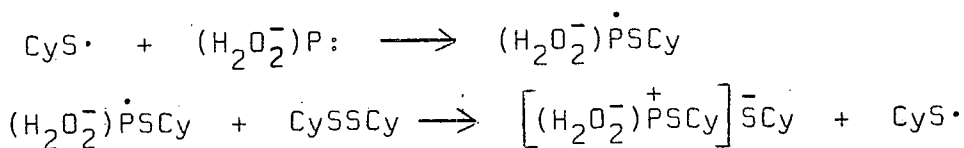
254 m μ , en moontlik geringe bydraes van 264.6, 265.3 en 266.4 m μ .

Dit is bekend dat sistien lig van golflengte 254 m μ absorbeer^{20,140,375}, en aangesien die energie van lig met golflengte 254 m μ 112 Kkal/mol is, terwyl die bindingsdissosiasie-energie van 'n disulfiedbinding ongeveer 70 Kkal/mol is²³⁹, volg dat lig van hierdie golflengte in staat moet wees om disulfiede te homoliseer:



Die bepaling van die kwantumopbrengste van sisteïen by die foto-geïnduseerde sistien/hipofosfiet-reduksiereaksie het getoon dat Φ heelwat groter as 1.0 is, vir al die gevalle wat ondersoek is (tabel VIII), wat beteken dat 'n kettingreaksie plaasgevind het na die primêre homolisestap^{152,264}. Hierdie bevindings getuig verder ten gunste van die meganisme wat voorheen³⁵¹ vir dié reaksie voorgestel is. Volgens hierdie meganisme word 'n tiëlradikaal gevorm, wat die kettingproses aan die gang

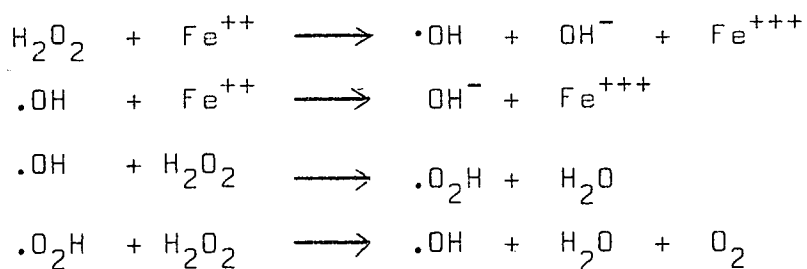
sit deurdat dit met 'n hipofosfietioon reageer om 'n fosforanielradikaal te vorm. Laasgenoemde val vervolgens 'n sistienmolekule aan en 'n dubbelsout en 'n verdere tiëlradikaal word gevorm. Die kettingproses word voortgesit totdat deaktivering van die tiëlradikaal plaasvind.



Lyons²³⁷ het gevind dat die kwantumopbrengs by die bestraling van sistien in verdunde HCl ongeveer 0.02 is en dat dit nie afhanklik is van die konsentrasie van die disulfied nie. Ons bevindings dat die kwantumopbrengste nie noemenswaardig deur veranderinge in die konsentrasie van die sistien beïnvloed word nie, is in ooreenstemming hiermee. Die konsentrasie van die hipofosfiet het daarenteen 'n belangrike invloed op die kwantumopbrengs en die feit dat die kwantumopbrengs progressief verhoog word deur 'n toename in die hipofosfietioonkonsentrasie, kan verklaar word deurdat daar by hoër natriumhipofosfietkonsentrasies 'n groter moontlikheid bestaan dat die gevormde tiëlradikaal met 'n hipofosfietmolekule kan reageer, voordat dit deur terminasieprosesse uitgeskakel word.

(ii) Die inisiasie van die sistien/hipofosfietreduksie deur radikaalopwekkers van 'n chemiese aard:

Daar bestaan verskeie radikaalopwekkers wat nie afhanklik is van ultravioletlig of verhitting vir die verskaffing van vry radikale nie, maar wat op 'n chemiese grondslag berus^{8,230}. Ons het die invloed van so 'n chemiese radikaalopwekker ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{++}$) op die reduksie van sistien deur hipofosfietione bestudeer. Uit die resultate (tabel IX) blyk dat slegs 'n kombinasie van al drie die reagentiese nl. hipofosfiet, ferroammoniumsulfaat en waterstofperoksied, in staat is om reduksie van sistien te veroorsaak. Haber en Weiss¹⁶¹ het voorgestel dat ferro-ione die ontbinding van H_2O_2 kataliseer om vry radikale te vorm, en na bewering verloop die reaksie as volg:-



Dit volg dus dat vry radikale in die oplossing gevorm word, in welke geval radikaaloordrag met die disulfied kan plaasvind, sodat hierdie reaksie volgens 'n vry radikaalmeganisme kan verloop. 'n Ondersoek van die sistien/hipofosfiereaksiemengsel wat met $\text{Fe}^{++}/\text{H}_2\text{O}_2$ behandel is, het dan ook inderdaad die teenwoordigheid van dieselfde twee intermediêre reaksieprodukte as wat by die lig-geïnduseerde reduksie gevind is, aangetoon. Dus word aangeneem dat albei hierdie reaksies volgens dieselfde meganisme verloop. By die lig-geïnduseerde reaksie word 'n vry tiëlradikaal gevorm deur homolise van sistien, terwyl $\cdot\text{OH}$ - of $\cdot\text{OH}_2$ -radikale vanaf die chemiese inisiator gevorm word, wat dan deur 'n radikaaloordragmeganisme tiëlradikale uit die disulfied vorm. Die tiëlradikale reageer verder met 'n hipofosfiatioon om 'n fosforanielradikaal te gee, wat soos voorheen met sistien reageer om 'n dubbelsout en verdere tiëlradikaal te vorm.

Die verloop van die radikaal-geïnduseerde reaksie is nie pH-afhanklik nie, in die gebied wat ondersoek is (tabel IX), maar net soos in die geval van die lig-geïnduseerde reaksie, en ongetwyfeld om dieselfde rede, is die konsentrasie van die hipofosfiat van die allergrootste belang en neem die graad van reduksie verkry, skerp toe met toenemende hipofosfiat-konsentrasie. Hoewel die reaksie maklik verloop, het dit as reduksiemetode sekere beperkings omdat kwantitatiewe reduksie nie verkry kan word nie.

(iii) Die termies-geïnduseerde reduksie van sistien deur hipofosfiat:

Allê gegewens dui daarop dat die reduksie van sistien deur hipofosfiat deur 'n vry radikaalmeganisme verloop in die geval waar hierdie reaksie in die teenwoordigheid van ultravioletlig of 'n chemiese vry radikaalopwekker uitgevoer word. Dit is verder ook moontlik om hierdie reduksie te induseer deur gebruik te maak van verhitting³⁴⁸; maar in die geval van die termies-geïnduseerde reaksie kon nie met sekerheid vasgestel word of dieselfde meganisme hier gevolg word nie, aangesien dit bekend is dat die intermediêre produkte wat by die lig-geïnduseerde reduksie gevorm word, deur hitte ontbind word³⁴⁸.

In 'n poging om verdere inligting oor die meganisme van die termies-geïnduseerde reduksie te bekom, is enkele aspekte van hierdie reaksie vervolgens ondersoek.

Uit die resultate (tabel X) blyk dat die termies-geïnduseerde reaksie alleenlik by pH 5.2 en nie in 0.1 M HCl-medium of by pH 9.3 verloop nie, vir die tye wat ondersoek is. By pH 5.2 het die reaksie 'n sekere induksietyd getoon voordat die reduksie plaasvind. Hierdie induksietyd is nie baie reproduseerbaar nie, maar in al die gevalle het die reaksie soos 'n ketting-proses verloop deurdat 'n geleidelike toename in die tiolinhoud van die reaksiemengsel ondervind is, totdat 'n sekere kritiese waarde bereik word, waarna die reduksie dan skielik volledig verloop het. 'n Ondersoek (elektroforesis) van die produkte in die reaksiemengsel het in al die gevalle slegs die teenwoordigheid van sistien/sisteïen aangetoon, terwyl geeneen van die intermedieë reaksieprodukte wat in die lig-geïnduseerde reaksie gevorm word, aanwesig was nie. Swanepoel³⁴⁸ het voorheen gevind dat die induksietyd van bogenoemde reduksie aansienlik verkort kan word deur spoorhoeveelhede tiol by die reaksiemengsel te voeg. Ons het hierdie ondersoek verder uitgebrei en gevind dat die tiol-gekataliseerde, termies-geïnduseerde reduksie van sistien deur hipofosfietione nie in 0.1 M HCl of by pH 9.3 verloop nie, maar wel by pH 5.2. Verder is ook gevind dat hierdie reduksie versnel word deur toenemende hoeveelhede tiol by die reaksiemengsel te voeg (figuur XX).

Soos reeds voorheen genoem, kan trivalente fosforverbindinge 'n disulfiedbinding volgens 'n radikaal- of ioniese meganisme splits. Uit die literatuur-oorsig wat in die inleidende deel gegee is, blyk dat daar heelwat bewyse bestaan dat disulfiedbindings wel termiese homolise kan ondergaan om tielradikale te vorm, en gevolglik is dit moontlik dat 'n termiese homolise van sistien kan plaasvind as die eerste stap in die sistien/hipofosfiet-reduksiereaksie. Dit is ook 'n algemeen erkende feit dat tiol, net soos disulfiede, in staat is om tielradikale deur homolise te vorm²⁸³. Hierdie reaksie⁵ is reeds in 1928 waargeneem en vandag is daar talle gevalle bekend waar tiol deur termiese of fotolitiese homolise tielradikale gevorm het¹⁹². Indien 'n tiol makliker as 'n disulfied termiese homolise ondergaan, kan dit moontlik ten gunste van 'n vry radikaalmeganisme getuig vir bogenoemde reaksie.

'n Studie van die literatuur toon dat daar nog nie sekerheid bestaan oor hierdie vraag nie. Crawshaw⁷⁵ het 'n aantal jare gelede die bewering gemaak dat sistien

in staat is om die polimerisasie van α -metielakrielsuur te inisieer, maar sisteënhydrochloried nie. Dit het daartoe gelei dat aanvaar is dat disulfiede makliker as tirole homolise kan ondergaan. Hierdie gedagte is verder versterk deurdat die bindingsdissosiasie-energie^{134,283} van tirole (ca. 90 Kkal/mol) heelwat hoër is as dié van disulfiedbindings (ca. 70 Kkal/mol). In teenstelling met die bevindings van Crawshaw dui dié van Madaras en medewerkers²⁴¹ daarop dat tirole makliker as disulfiede homolise ondergaan. Hulle het die polimerisasie van metakrielsuur met normale en gereduseerde wol ondersoek en gevind dat daar 'n groter mate van polimerisasie in laasgenoemde geval plaasgevind het, wanneer chemiese radikaalopwekkers gebruik is. (Die kettingmeganisme waarvolgens hierdie polimerisasies plaasvind, is volledig in die inleiding bespreek.) Verdere studies op vry sistien en sisteëne het bevestig dat die tiol makliker homolise ondergaan; dit word duidelik geïllustreer deur die volgende tabel, geneem uit die publikasie van Madaras²⁴¹.

Reagens	Persentasie Polimerisasie
Kontrole (wol en sistien afwesig)	4.4
Normale wol	45.4
Gereduseerde wol	61.4
Sistien	29.3
Sisteëne	48.0

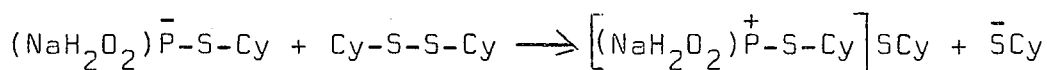
Schöberl³¹² het soortgelyke resultate met sy studies gevind en hy het die bewering gemaak dat 'n hoër aktiveringsenergie nodig is vir die homolitiese splitsing van disulfiedbindings as vir S-H-bindings. Die meeste eksperimentele gegewens dui dus daarop dat S-H-bindings makliker as S-S-bindings homolise ondergaan. Indien dit wel die geval is, kan die feit dat die termies-geïnduseerde reduksie van sistien deur hipofosfietione gekataliseer word deur die byvoeging van tirole, ten gunste van 'n vry radikaalmeganisme getuig. Dit is egter nie moontlik om al die eksperimentele bevindings bevredigend met behulp van hierdie meganisme te verduidelik nie. Dit is veral moeilik om die feit dat die tiol-gekataliseerde reaksie pH-afhanklik is en nie in sterk suur of alkaliese medium verloop nie, met behulp van 'n vry radikaalmeganisme te verduidelik, tensy aanvaar word dat die vorming van vry radikale uit tirole en disulfiede pH-afhanklik is. Ongelukkig is daar nie inligting oor

hierdie aspek beskikbaar nie en kan geen mening hieroor uitgespreek word nie.

Die eksperimentele gegewens dui daarop dat 'n sekere hoeveelheid tiol nodig is voordat die reduksie kan plaasvind, en aangesien die reaksie pH-afhanklik is, het die vermoede ontstaan dat dit deur die merkaptiedioon (RS^-) verloop en dus waarskynlik 'n ioniese meganisme volg. Die meganisme van die tiol-gekataliseerde reaksie kan dan ook bevredigend verklaar word as aanvaar word dat natriumphosfaat as elektrofiel reagens kan optree, deur as volg met 'n merkaptiedioon te reageer:-



Bogenoemde hipotese kan natuurlik alleenlik geldig wees indien natriumphosfaat as elektrofiel reagens kan optree. Cadogan⁴⁵, 'n outoriteit op die gebied van die chemie van fosforverbindings, het aangevoer dat trivalente fosforverbindings wel in sommige gevalle as elektrofiel reagent kan optree. Hy het hierdie bewering gemaak na bevindinge dat die reduksie van piridien-N-oksied deur verskillende trivalente fosforverbindings vertraag word in die gevalle waar elektrononttrekkende groepe aan die fosforatoom gebind is. Hierdie hipotese is bevestig deur soortgelyke bevindinge van Emerson¹⁰³. Die tiol-gekataliseerde reaksie vind dus waarskynlik plaas deurdat natriumphosfaat as elektrofiel reagent optree en met die tiol reageer soos hierbo beskryf is, waarna die produk verder met sistien reageer:-

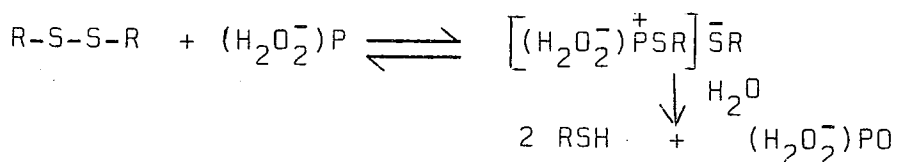


Die merkaptiedione wat in bogenoemde reaksie vrygestel word, reageer verder met natriumphosfaat, en dit verklaar die kettingmeganisme wat in hierdie studies waargeneem is. Hierdie ioniese meganisme pas baie goed in by die eksperimentele bevindinge (figuur XX). Die reaksie verloop nie in 0.1 M HCl nie, omdat die tiolgroep van sistien in die ongedissosieerde (R-SH) vorm is by hierdie pH. Aangesien daar skynbaar 'n sekere kritiese konsentrasie tiol nodig is voordat die reaksie verloop, kan dit verklaar waarom geen reduksie in alkaliese medium plaasvind nie, want dit is bekend dat tiol baie vinnig na disulfiede oksideer onder hierdie toestande³⁵⁵. By die tiol-gekataliseerde reaksies wat in alkaliese medium uitgevoer is, is inderdaad gevind dat die hoeveelheid tiol wat bygevoeg is, vinnig afgeneem het met verloop van tyd.

Dit bring ons by die laaste probleem nl. die meganisme waarvolgens die tiol gevorm word gedurende die induksietyd by die termies-geïnduseerde reaksie. Uit die resultate is dit duidelik dat daar 'n kritiese hoeveelheid tiol nodig is voordat die reduksiereaksie verloop, en in al die gevalle word dié tiol uit die disulfied gevorm gedurende die induksietyd. Hierdie kritiese hoeveelheid tiol wat nodig is vir die inisiasie, word net gouer bereik wanneer die reaksie gekataliseer word deur tirole by die reaksiemengsel te voeg. Aangesien hierdie reaksie skynbaar nie volgens 'n vry radikaal-meganisme verloop nie, kan die vorming van sisteëne nie toegeskryf word aan termiese homolise nie. Daar is twee verdere meganismes waarvolgens dit kan vorm, o.a. 'n termies-geïnduseerde dissosiasie van die disulfied:-



In hierdie geval behoort die reaksiemengsels die teenwoordigheid van klein hoeveelhede ontbindingsprodukte van die RS^+ -vorm (gewoonlik sulfien- en sulfoonsure) te toon, wat egter nie die geval was nie. Die enigste ander moontlike verklaring vir die vorming van die sisteëne is dat die primêre stap 'n stadige nukleofiele aanval van hipofosfietione op die disulfiedbinding behels, volgens die meganisme wat deur Foss¹²⁹ en Challenger⁶¹ voorgestel is:-



Sodra die kritiese hoeveelheid tiol volgens hierdie meganisme gevorm is, reageer dit met die natriumhipofosfiet en verloop die reaksie verder volgens die meganisme wat hierbo voorgestel is.



VERWYSINGS

1. Abrahams, S.C., Quart. Revs. 10, 407 (1956).
2. Anderson, L. en Plaut, G.W.E., in "Respiratory Enzymes", H.A. Lardy (redakteur), Burgess Publ. Co., Minneapolis, (1949).
3. Anfinsen, C.B., in "Enzyme Models and Enzyme Structure, Brookhaven Symposia in Biology", No. 15, 194 (1962).
4. Anson, M.L., Adv. Prot. Chem. 2, 361 (1945).
5. Ashworth, F. en Burkhardt, G.N., J. Chem. Soc. 1791 (1928).
6. Azari, P., Arch. Biochem. Biophys. 115, 230 (1966).
7. Backer, H.J., Rec. trav. chim. 51, 981 (1932).
8. Bacon, R.F., Trans. Faraday Soc. 42, 140 (1946).
9. Bacon, R.F. en Fanelli, R., J. Am. Chem. Soc. 65, 639 (1943).
10. Bacq, Z.M., "Chemical Protection Against Ionizing Radiation", C.C. Thomas Publ. Co., Springfield, (1965).
11. Bacq, Z.M., Hervee, A., Lecomte, J., Fischer, P., Blavier, J., Dechamps, G., Le Bihan, H. en Rayet, P., Arch. Intern. Physiol. 49, 442 (1951).
12. Baer, J.E. en Carmack, M., J. Am. Chem. Soc. 71, 1215 (1949).
13. Bailey, J.L., Biochem. J. 67, 21P (1957).
14. Bailey, J.L. en Cole, D.R., J. Biol. Chem. 234, 1733 (1959).
15. Ball, J.S., in "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 13, Interscience Publ. Co., New York, (1954).
16. Barltrop, J.A., Hayes, P.M. en Calvin, M., J. Am. Chem. Soc. 76, 4348 (1954).
17. Bartlett, P.D. en Meguerian, G., J. Am. Chem. Soc. 78, 3710 (1956).
18. Bateman, L., Moore, C.G. en Porter, M., J. Chem. Soc. 2866 (1958).
19. Bauer, J.E. en Carmack, M., J. Am. Chem. Soc. 71, 1215 (1949).
20. Beaven, G.H. en Holiday, E.R., Adv. Prot. Chem. 7, 326 (1952).
21. Benesch, R.E. en Benesch, R., J. Am. Chem. Soc. 77, 2749 (1955).
22. Benesch, R.E. en Benesch, R., J. Am. Chem. Soc. 77, 5877 (1955).

23. Benesch, R.E., Lardy, H.A. en Benesch, R., J. Biol. Chem. 216 663 (1955).
24. Bergman, M. en Stather, F., Z. Physiol. Chem. 152, 189 (1926).
25. Bergson, G., Arkiv Kemi 12, 233 (1958).
26. Bergson, G., Arkiv Kemi 16, 315 (1958).
27. Bergson, G. en Schotte, L., Arkiv Kemi 13, 43 (1958).
28. Bersin, T. en Steudel, J., Chem. Ber. 71, 1015 (1938).
29. Bertozzi, E.R., J. Polymer Sci. 2, 39 (1959).
30. Birch, S.F., Cullum, T.V. en Dean, R.A., J. Inst. Petr. Technol. 39, 206 (1953).
31. Bitny-Szlachto, S., Acta Pol. Pharm. 17, 373 (1960).
32. Bitny-Szlachto, S., Kosinski, J. en Niedzielska, M., Acta Pol. Pharm. 20, 347 (1963).
33. Blumenfeld, O.A. en Perlmann, G.E., J. Biol. Chem. 236, 2472 (1961).
34. Bogle, G.S., Burgess, V.R., Forbes, W.F. en Savige, W.E., Photochem. Photobiol. 1, 277 (1962).
35. Borsook, H., Ellis, E.L. en Huffman, W.M., J. Biol. Chem. 117, 281 (1937).
36. Bovey, F.A. en Yanari, S.S., in "The Enzymes", Vol. IV, Boyer, Lardy en Myrbäck (redakteurs), Academic Press, New York, (1961).
37. Bowen, E.J., "The Chemical Aspects of Light", Oxford University Press, London, (1946).
38. Boyer, P.D., in "The Enzymes", Vol. I, Boyer, Lardy en Myrbäck (redakteurs), Academic Press, New York, (1959).
39. Brandt, J.C.D. en Davidson, J.R., J. Chem. Soc. 15 (1956).
40. Brandt, G.A.R., Emeleus, H.J. en Haszeldine, R.N., J. Chem. Soc. 2549 (1952).
41. Bruice, T. en Markiv, R., J. Am. Chem. Soc. 79, 3150 (1957).
42. Bruning, W. en Holtzer, A., J. Am. Chem. Soc. 83, 4865 (1961).
43. Bunnett, J., J. Am. Chem. Soc. 79, 5969 (1957).
44. Burley, R.W., Nature 175, 510 (1955).
45. Cadogan, J.I.G., Quart. Revs. 16, 208 (1962).
46. Calvin, M., in "Glutathione, a Symposium", Colowick et al. (redakteurs), Academic Press, New York, (1954).
47. Calvin, M., Fed. Proc. 13, 697 (1954).
48. Cambron, A., Canad. J. Res. 2, 341 (1930).
49. Cambron, A. en Whitby, G.S., Canad. J. Res. 2, 144 (1930).

50. Cannan, R.K. en Knight, B.C.J.G., *Biochem. J.* 21, 1384 (1927).
51. Cartmell, E. en Fowles, G.W.A., "Valency and Molecular Structure", Academic Press, New York, (1956).
52. Cavallito, C.J., *J. Biol. Chem.* 164, 29 (1946).
53. Cecil, R., *Biochem. J.* 76, 156 (1960).
54. Cecil, R., in "The Proteins", Vol. 1, Neurath (redakteur), Academic Press, New York, (1963).
55. Cecil, R. en Loening, U.E., *Biochem. J.* 76, 146 (1960).
56. Cecil, R. en McPhee, J.R., *Biochem. J.* 59, 239 (1955).
57. Cecil, R. en McPhee, J.R., *Biochem. J.* 60, 496 (1955).
58. Cecil, R. en McPhee, J.R., *Adv. Prot. Chem.* 14, 303 (1959).
59. Cecil, R. en Wake, R.G., *Biochem. J.* 82, 401 (1962).
60. Cecil, R. en Weitzman, P.D.J., *Biochem. J.* 93, 1 (1964).
61. Challenger, F. en Greenwood, D., *J. Chem. Soc.* 26 (1950).
62. Challenger, F., Higginbottom, C. en Ellis, L., *J. Chem. Soc.* 59 (1933).
63. Chang, S.H. en Wilken, D.R., *J. Biol. Chem.* 240, 3136 (1965).
64. Clarke, H.T., *J. Biol. Chem.* 97, 235 (1932).
65. Clarke, W.M., "Oxidation-reduction Potentials of Organic Systems", Bailliere, Tindall en Cox, London (1960).
66. Cleland, W.W. *Biochemistry* 3, 480 (1964).
67. Cohn, E.J., *Ergeb. Physiol.* 33, 781 (1931).
68. Colacicco, G., *Nature* 198, 583 (1963).
69. Coletta, M., Benerecetti, S.A. en de Marco, C., *Italian J. Biochem.* 10, 244 (1961).
70. Colodny, P.C. en Tobolsky, A.V., *J. Appl. Polymer Sci.* 2, 39 (1959).
71. Corey, R.B. en Pauling, L., *Proc. Roy. Soc. (London)* B141, 10 (1953).
72. Cottrell, T.L., "The Strength of Chemical Bonds", Academic Press, New York, (1954).
73. Cox, J.R. en Jeffrey, G., *Proc. Roy. Soc. (London)* A110, 207 (1951).
74. Crawhall, J.C., Scowen, E.F. en Watts, R.W.E., *Brit. Med. J.* 1, 1411 (1964).
75. Crawshaw, G.H. en Speakman, J.B., *J. Soc. Dyers and Col.* 70, 81 (1954).
76. Danehy, J.P. en Noel, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2511 (1960).
77. Davis, R.E. en Perrin, C., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 1590 (1960).

78. Davis, R.E., Cohen, A. en Louis, J.B., J. Am. Chem. Soc. 85, 3050 (1963).
79. Davis, R.E., Louis, J.B. en Cohen, A., J. Am. Chem. Soc. 88, 1 (1966).
80. de Deken, R.W., Broekhuysen, J., Bechet, J. en Mortier, A., Biochem. Biophys. Acta 19, 45 (1956).
81. De la Mare, P.B.D., Fowden, L., Hughes, E.D., Ingold, C.K. en Mackie, J.D.H., J. Chem. Soc. 3200 (1955).
82. De Marco, C., Mosti, R. en Cavallini, D., J. Chromatog. 18, 492 (1965).
83. De Marco, C., Bombardieri, G., Bruzzesi, M.R. en Rossi Fanelli, A., Ital. J. Biochem. 14, 39 (1965).
84. De Marco, C., Coléttta, M., Mondovi, B. en Cavallini, D., Ital. J. Biochem. 9, 3 (1960).
85. Diez, M.J.F., Osuga, D.T. en Feeney, R.E., Arch. Biochem. Biophys. 107, 449 (1964).
86. Donohue, J. en Schomaker, V., J. Chem. Phys. 16, 92 (1948).
87. Drabikowski, W. en Bitny-Szlachto, S., Acta Biochem. Pol. 11, 421 (1964).
88. Durrant, P.J. en Durrant, B., "Introduction to Advanced Inorganic Chemistry", Longmans, London, (1962).
89. Du Vigneaud, V., Fitch, A., Pekarek, E. en Lockwood, W.W., J. Biol. Chem. 94, 233 (1951).
90. Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, P.G. en Gordon S., J. Am. Chem. Soc., 75, 4879 (1953).
91. Eager, J.E. en Savige, W.E., Photochem. Photobiol. 2, 25 (1963).
92. Edsall, J.T., Martin, B.M. en Hollingworth, B.R., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 44, 505 (1958).
93. Edwards, J.O. en Pearson, R.G., J. Am. Chem. Soc. 84, 16 (1962).
94. Eldjarn, L., Strahlenwirk und Milieu 51, 232 (1962).
95. Eldjarn, L. en Pihl, A., J. Biol. Chem. 223, 341 (1956).
96. Eldjarn, L. en Pihl, A., "Progress in Radiobiol.", Oliver en Boyd, Londen, (1956).
97. Eldjarn, L. en Pihl, A., J. Am. Chem. Soc. 79 4589 (1957).
98. Eldjarn, L. en Pihl, A., J. Biol. Chem. 225, 499 (1957).
99. Eldjarn, L. en Pihl, A., "25th Anniversary Publ. from the Norwegian Radium Hospital", No. 3, 253 (1958).

100. Eliel, E.L., in "Steric Effects in Organic Chemistry", Newman (redakteur), J. Wiley and Sons Inc., New York, (1956).
101. Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys. 74, 443 (1958).
102. Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).
103. Emerson, J., Ph.D.-Tesis, London Universiteit, (1960).
104. Epstein, C.J. en Anfinson, C.B., J. Biol. Chem. 237, 2175 (1962).
105. Epstein, C.J., Goldberger, R.F. en Anfinson, C.B., in "Synthesis and Structure of Macromolecules, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology", 28, 439 (1963).
106. Erämetsä, O. en Suonuuti, H., Suomen Kemistilehti 32B, 47 (1959).
107. Fava, A. en Iliceto, A., Ann. Chim. Appl. Rome 43, 509 (1953).
108. Fava, A. en Iliceto, A., J. Am. Chem. Soc. 80, 3478 (1958).
109. Fava, A. en Pajarro, G., J. Am. Chem. Soc. 78, 5203 (1956).
110. Fava, A., Iliceto, A. en Camera, E., J. Am. Chem. Soc. 79, 833 (1957).
111. Fava, A., Iliceto, A. en Camera, E., J. Am. Chem. Soc. 79, 1763 (1957).
112. Fehrer, F. en Berthold, H.J., Chem. Ber. 88, 1634 (1955).
113. Fehrer, F., Krause, G. en Vogelbruch, K., Chem. Ber. 90, 1570 (1957).
114. Feilchenfeld, H., J. Phys. Chem. 61, 1133 (1957).
115. Ferdinand, W., Stein, W.H. en Moore, S., J. Biol. Chem. 240, 1150 (1965).
116. Ferington, T.E. en Tobolsky, A.V., J. Am. Chem. Soc. 80, 3215 (1958).
117. Fleming, W. en Klein, K., Duitse Patent 444014 (1927).
118. Flodin, P., Tesis, A.B. Pharmacia, Uppsala, Swede, (1962).
119. Fong, C.T.O., Silver, L., Popenoe, E.A. en Debons, A.I., Biochim. Biophys. Acta 56, 190 (1962).
120. Forbes, W.F. en Savige, W.E., Photochem. Photobiol. 1, 1 (1962).
121. Forbes, W.F. en Savige, W.E., Photochem. Photobiol. 1, 77 (1962).
122. Forbes, W.F., Rivett, D.E. en Savige, W.E., Photochem. Photobiol. 1, 217 (1962).

123. Foss, O., Kgl. Norske Videnskab. Selskab Skrifter 1945, No. 2 (1947).
124. Foss, O., Acta Chem. Scand. 1, 8 (1947).
125. Foss, O., Acta Chem. Scand. 1, 307 (1947).
126. Foss, O., Acta Chem. Scand. 3, 1385 (1949).
127. Foss, O., Acta Chem. Scand. 4, 404 (1950).
128. Foss, O., Acta Chem. Scand. 4, 866 (1950).
129. Foss, O., in "Organic Sulfur Compounds", Kharasch (redakteur), Vol. I, Pergamon Press, London, (1959).
130. Foss, O., en Tjomsland, O., Acta Chem. Scand. 11, 1424, (1957).
131. Foss, O., en Tjomsland, O., Acta Chem. Scand. 12, 1810 (1958).
132. Fraenkel-Conrat, H., Simpson, M.E. en Evans, H.M., J. Biol. Chem. 142, 107 (1948).
133. Fraenkel-Conrat, H., Mohammed, A., Ducay, E.D. en Mecham, D.K., J. Am. Chem. Soc. 73, 625 (1951).
134. Franklin, J.L. en Lumpkin, H.E., J. Am. Chem. Soc. 74, 1023, (1952).
135. Frater, R., Hird, F.J.R., Moss, H.J. en Yates, J.R., Nature 186, 451 (1960).
136. Fredga, A., Arkiv Kemi A12, No. 13 (1937).
137. Freedman, L.D. en Corwin, A.H., J. Biol. Chem. 181, 601 (1949).
138. Friedman, M., Cavins, J.F. en Wall, J.S., J. Am. Chem. Soc. 87, 3672 (1965).
139. Frimpter, G.W., J. Biol. Chem. 236, PC51 (1961).
140. Fromageot, C. en Schnek, G., Biochim. Biophys Acta 6, 113 (1950).
141. Fromm, E., Chem. Ber. 40, 2061 (1907).
142. Gaff, D.F., Austl. J. Biol. Sci. 19, 291 (1966).
143. Gardner, D.M. en Fraenkel, G.K., J. Am. Chem. Soc. 78, 3279 (1956).
144. Garfinkel, D. en Edsall, J.T., J. Am. Chem. Soc. 80, 3823 (1958).
145. Gee, G., Trans. Faraday Soc. 48, 515 (1952).
146. Gee, G., Sci. Progr. 43, 193 (1955).
147. Gee, G., Fairbrother, E. en Merrall, G.T., J. Polymer Sci. 16, 459 (1955).
148. Ghosh, J.C. en Ganguli, S.C., Biochem. Z. 279, 296 (1935).
149. Ghosh, J.C. en Ganguli, S.C., Biochem. J. 28, 381 (1937).
150. Giarnieri, D., Bernini, L. en de Marco, C., Ital. J. Biochem. 11, 389 (1962).
151. Givol, D., de Lorenzo, F., Goldberger, R.F. en Anfinsen, C.B., Biochemistry 53, 676 (1965).

152. Glasstone, S., "Textbook of Physical Chemistry", 2^e Uitgawe, Macmillan Co., London, (1955).
153. Glasstone, S., Laidler, K.J. en Eyring, H., "The Theory of Rate Processes", McGraw-Hill Book Co., New York, (1941).
154. Glocker, G., J. Chem. Phys. 21, 1242 (1953).
155. Goddard, D.R. en Michaelis, L., J. Biol. Chem. 106, 605 (1934).
156. Gordy, W., J. Chem. Phys. 14, 304 (1946).
157. Gordy, W. en Miyagawa, I., Radiation Research 12, 211 (1960).
158. Green, D.E., Biochem. J. 27, 678 (1933).
159. Guryanova, E.N. en Vasileva, V.N., Zhur. Fiz. Khim. 29, 576 (1955).
160. Guthrie, G.B. Scott, D.W. en Waddington, G., J. Am. Chem. Soc. 76, 1488 (1954).
161. Haber, R. en Weiss, J., Proc. Roy. Soc. (London) A147, 332 (1939).
162. Hamm, R. en Hofmann, K., Nature 207, 1269 (1965).
163. Hantsch, A. en Wolvekamp, M., Ann. 331, 265 (1904).
164. Henriksen, T., in "Free Radicals in Biological Systems, Proc. Symposium Stanford University", Blois (redakteur), Academic Press, New York, (1960).
165. Hettler, H. in "Chromatographic Reviews", Vol. I, Lederer (redakteur), Elsevier Publ. Co., Amsterdam, (1959).
166. Himel, C.M. en Edwards, L.O., Chem. Abstr. 46, 6149 (1952).
167. Hoffman, F.W., Ess, R.J., Simmons, T.C. en Hanzel, R.S., J. Am. Chem. Soc. 78, 6414 (1956).
168. Hörner, L. en Hoffman, H.W., Angew. Chem. 68, 473 (1956).
169. Huggins, M.L., J. Am. Chem. Soc. 75, 4123 (1953).
170. Huggins, C., Tapley, D.F. en Jensen, E.V., Nature 167, 592 (1951).
171. Hughes, W.L., J. Am. Chem. Soc. 69, 1836 (1947).
172. Hughes, W.L., Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 14, 79 (1949).
173. Humphrey, R.E. en Hawkins, J.M., Anal. Chem. 36, 1812 (1964).
174. Hunter, M.J. en McDuffie, F.C., J. Am. Chem. Soc. 37, 164 (1965).
175. Jacobsen, H.I., Harvey, R.G. en Jensen, E.V., J. Am. Chem. Soc. 77, 6064 (1955).
176. Jauregui-Adell, J., Jolles, J. en Jolles, P., Biochim. Biophys. Acta 107, 97 (1965).

177. Jencks, W.P. en Carriuolo, J., J. Am. Chem. Soc. 82, 1778 (1960).
178. Jenkins, A.D. en Wolfram, L.J., J. Soc. Dyers and Col. 79, 55 (1963).
179. Jensen, E.V., Science 130, 1319 (1959).
180. Jensen, E.V., Hospelhorn, V.D., Tapley, D.F. en Huggins, C., J. Biol. Chem. 185, 411 (1950).
181. Jolles, P., in "The Enzymes", Vol. II, Boyer, Lardy en Myrbäck (redakteurs), Academic Press, New York, (1960).
182. Kakol. I., Gruda, J. en Bitny-Szlachto, S., Acta Biochim. Pol. 11, 411 (1964).
183. Kallistratos, G. en Timmerman, A., Naturwissen. 50, 692 (1963).
184. Kanarak, L., Bradshaw, R.A. en Hill, R.L., J. Biol. Chem. 240, PC2755 (1965).
185. Kassel, B. en Brand, E., J. Biol. Chem. 125, 131 (1938).
186. Katchalski, E., Benjamin, G.S. en Gross, V., J. Am. Chem. Soc. 79, 4096 (1957).
187. Kauzman, W., Adv. Prot. Chem. 14, 1 (1959).
188. Kende, I., Pickering, T.L. en Tobolsky, A.V., J. Am. Chem. Soc. 87, 5582 (1965).
189. Kern, R.J., J. Am. Chem. Soc. 77, 1382 (1955).
190. Keuper, H.W., Z. Physiol. Chem. 184, 225 (1929).
191. Kharasch, M.S., Nudenberg, W. en Meltzer, T.H., J. Org. Chem. 18, 1233 (1953).
192. Kharasch, M.S., Read, A.T. en Mayo, F.R., Chem. and Ind. (London) 57, 792 (1938).
193. Kimball, G.E., in "Ann. Rev. of Physical Chem.", Vol. 2, Stanford, California, (1951).
194. Klotz, I.M., Science 128, 815 (1958).
195. Klotz, I.M. en Franzen, J.S., J. Am. Chem. Soc. 84, 3461 (1962).
196. Klotz, I.M., Ayers, J., Ho, J.Y.C., Horowitz, M.G. en Heiney, R.E., J. Am. Chem. Soc. 80, 2132 (1958).
197. Koch, H.P., J. Chem. Soc. 394 (1949).
198. Koch, H.P., J. Chem. Soc. 401 (1949).
199. Koeppe, O.J., Boyer, P.D. en Stulberg, M.P., J. Biol. Chem. 219, 569 (1956).
200. Kolthoff, I.M. en Harris, M., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 18, 161 (1946).
201. Kolthoff, I.M. en Stricks, W., Anal. Chem. 23, 763 (1951).
202. Kolthoff, I.M. en Willeford, B.R., J. Am. Chem. Soc. 80, 5673 (1958).

203. Kolthoff, I.M.; Anastasi, A. en Tan, B.H., J. Am. Chem. Soc. 80, 3235 (1958).
204. Kolthoff, I.M., Stricks, W. en Kapoor, R.C., J. Am. Chem. Soc. 77, 4733 (1955).
205. Kolthoff, I.M., Stricks, W. en Tanaka, N., J. Am. Chem. Soc. 77, 739 (1955).
206. Kosolapoff, G.M., "Organophosphorus Compounds", J. Wiley and Sons Inc., New York, (1951).
207. Krebs, H., Z. Naturforsch. 12B, 795 (1957).
208. Kreevoy, M.M., Harper, E.T., Duvall, R.E., Wilgus, H.S., en Ditsch, C.T., J. Am. Chem. Soc. 82, 4899 (1960).
209. Kurita, Y. en Gordy, W., J. Chem. Phys. 34, 282 (1961).
210. Kushner, L.M., Gorin, G. en Smyth, C.P., J. Am. Chem. Soc. 72, 477 (1950).
211. Lamfron, H. en Nielsen, S.O., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim. 30, 349 (1958).
212. Laskowski, M. en Scheraga, H.A., J. Am. Chem. Soc. 76, 6305 (1954).
213. Latimer, W.M., "Oxidation Potentials", Prentice-Hall Publ., New York, (1952).
214. Leach, S.J., Austl. J. Chem. 13, 520 (1960).
215. Leach, S.J., Austl. J. Chem. 13, 547 (1960).
216. Leach, S.J. en Swan, J.M., Austl. J. Chem. 15, 365 (1962).
217. Leach, S.J., Swan, J.M. en Holt, L.A., Biochim. Biophys. Acta 78, 196 (1963).
218. Leandri, G. en Tundo, A., Ann. Chim. (Rome) 44, 63 (1954).
219. Leandri, G. en Tundo, A., Ann. Chim. appl. 45, 180 (1955).
220. Leandri, G. en Tundo, A., Ann. Chim. (Rome) 45, 832 (1955).
221. Lecher, H., Chem. Ber. 53, 591 (1920).
222. Lecher, H.I., Science 120, 220 (1954).
223. Lecher, H.I. en Hardy, E.M., J. Org. Chem. 20, 475 (1955).
224. Lecher, H. en Simon, K., Chem. Ber. 54, 632 (1921).
225. Lecher, H. en Wittwer, M., Chem. Ber. 55, 1474 (1922).
226. Linderström-Lang, K.U. en Schellman, J.A., in "The Enzymes", Vol. I, Boyer, Lardy en Myrbäck (redakteurs), Academic Press, New York, (1959).
227. Lindley, H., J. Am. Chem. Soc. 77, 4927 (1955).
228. Lindley, H., Biochem. J. 74, 577 (1960).
229. Linko, P., Suomen Kem. 35, 77 (1962).
230. Lipson, M. en Speakman, J.B., J. Soc. Dyers and Col. 65, 390 (1949).

231. Little, C.A. en Dellamonico, E.S., J. Am. Chem. Soc. 79, 126 (1957).
232. Lorand, L., Physiol. Revs. 34, 742 (1954).
233. Louw, D.F., Swart, L.S. en Mellet, P., S. Afr. J. Agric. Sci. 6, 633 (1963).
234. Luft, N.W., Z. Elektrochem. 60, 94 (1956).
235. Lugg, J.W.K., Biochem. J. 26, 2144 (1932).
236. Lund, W. en Jacobsen, E., Acta Chem. Scand. 19, 1783 (1965).
237. Lyons, W.E., Nature 162, 1004 (1948).
238. Mackle, H., Tetrahedron 19, 1159 (1963).
239. Maclaren, A.D., Adv. Enzymol. 9, 75 (1949).
240. Maclaren, J.A., Austl. J. Chem. 15, 824 (1962).
241. Madaras, G.W. en Speakman, J.B., J. Soc. Dyers and Col. 70, 112, (1954).
242. Maurin, J. en Paris, R., Compt. rend. 231, 1297 (1950).
243. Mazia, D., Adv. Biol. and Med. Phys. 4, 69 (1956).
244. McAllan, D.T., Cullum, T.V., Dean, R.A. en Fidler, F.A., J. Am. Chem. Soc. 73, 3627 (1951).
245. McKelvie, N., Persoonlike mededeling in verwysing 79.
246. McKenzie, H.A., Smith, M.B. en Wake, R.G., Nature 176, 738 (1955).
247. McPhee, J.R., Biochem. J. 64, 22 (1956).
248. Meienhofer, J. en Brinhof, O., Nature 199, 1095 (1966).
249. Mellet, P., M.Sc.-verhandeling, Universiteit van S.A., (1966).
250. Mellor, J.W., "Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry", Longmans, Green & Co., London, (1922-1937).
251. Merkes, G. en Karush, F., J. Am. Chem. Soc. 79, 134 (1957).
252. Michalski, J. en Wasiak, J., J. Chem. Soc. 5057 (1962).
253. Milligan, B., Rivett, D.E. en Savige, W.E., Austl. J. Chem. 16, 1020 (1963).
254. Minoura, Y., J. Soc. Rubber Ind. Japan 23, 213 (1950).
255. Minoura, Y., J. Chem. Soc. Japan 73, 224 (1952).
256. Mirsky, A.E. en Anson, M.L., J. Gen. Physiol. 19, 427 (1936).
257. Moore, C.G. en Porter, M., J. Chem. Soc. 2890 (1958).
258. Moore, S. en Stein, W.H., J. Biol. Chem. 176, 367 (1948).
259. Moore, C.G. en Trego, B.R., J. Chem. Soc. 4205 (1962).
260. Moore, T.S. en Winmill, T.F., J. Chem. Soc. 1635 (1912).
261. Moroson, H. en Gregoriades, A., Nature 204, 676 (1964).
262. Müller, D.H. en Baumberger, J.P., Trans. Electrochem. Soc. 77, 181 (1937).

263. Nicolet, B.H., J. Am. Chem. Soc. 53, 3066 (1931).
264. Noyes, W.A. en Boekelheide, V., in "Techniques of Organic Chemistry", Vol. II, Weissberger (redakteur), Interscience Publ. New York, (1959).
265. Nozaki, Y. en Tanford, C., J. Biol. Chem. 238, 4074 (1963).
266. Olcott, S. en Fraenkel-Conrat, H., J. Biol. Chem. 171, 583 (1947).
267. Otsu, T., J. Polymer Sci. 21, 559 (1956).
268. Parker, C.A., Proc. Roy. Soc. (London) A220, 104 (1953).
269. Parker, A.J. en Kharasch, N., Chem. Revs. 59, 583 (1959).
270. Parker, A.J. en Kharasch, N., J. Am. Chem. Soc. 82, 3071 (1960).
271. Patt, H.M., Tyree, E.B., Straube, H.L. en Smith, D.E., Science 110, 213 (1949).
272. Pauling, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 35, 495 (1949).
273. Pauling, L., J. Phys. Chem. 58, 662 (1954).
274. Pauling, L., "The Nature of the Chemical Bond", 3^e Uitgawe, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, (1960).
275. Pauling, L. en Corey, R.B., Proc. Roy. Soc. (London) B141, 21 (1953).
276. Pierson, R.M., Costauza, A.J. en Weinstein, A.H., J. Polymer Sci. 17, 221 (1955).
277. Pirie, N.W. en Pinhey, K.G., J. Biol. Chem. 84, 321 (1929).
278. Porath, J., Clin. Chim. Acta 4, 776 (1959).
279. Porath, J., Biochim. Biophys. Acta 39, 193 (1960).
280. Porath, J. en Flodin, P., Nature 183, 1657 (1959).
281. Price, T.S. en Twiss, D.F., J. Chem. Soc. 97, 1177 (1910).
282. Pryor, W.A., Abs. of Papers, Am. Chem. Soc. Meeting, September 1961.
283. Pryor, W.A., "Mechanisms of Sulfur Reactions", McGraw-Hill, New York, (1962).
284. Putnam, F.W., in "The Proteins", Vol. IB, Neurath (redakteur), Academic Press, New York, (1953).
285. Reed, L.J., in "Organic Sulfur Compounds" Vol. 1, Kharasch (redakteur), Pergamon Press, Oxford, (1961).
286. Resnick, H., Carter, J.R. en Kalnitsky, G., J. Biol. Chem. 234, 448 (1959).
287. Rosengren, K.J., Acta Chem. Scand. 16, 1401 (1962).
288. Rosenthal, N.A., Tesis, Polytech, Inst. of Brooklyn, New York, (1956).

289. Rosenthal, N.A. en Oster, G., J. Soc. Cosm. Chem. 5, 286 (1954).
290. Rueggeburg, W.H.C., Cook, J. en Reed, E.E., J. Org. Chem. 13, 110 (1948).
291. Rueggeburg, W.H.C., Chernak, J., Rose, I.M. en Reed, E.E., J. Am. Chem. Soc. 70, 2292 (1948).
292. Runge, F., Jumar, A. en Held, P., J. Prakt. Chem. 8, 44 (1959).
293. Rykkan, L.R. en Schmidt, C.L.A., Univ. Calif. (Berkeley). Publ. Physiol. 8, 257 (1944).
294. Ryle, A.P. en Sanger, F., Biochem. J. 60, 535 (1955).
295. Sanger, F., Nature 171, 1025 (1953).
296. Sanger, F. en Thompson, E.O.P., Biochem. J. 53, 366 (1953).
297. Sanger, F. en Tuppy, H., Biochem. J. 49, 481 (1951).
298. Saville, B., J. Chem. Soc. Proc. 160 (1959).
299. Schellman, J.A., Compt. rend. 29, 223 (1955).
300. Schenk, J., Physica 23, 325 (1957).
301. Scheraga, H.A., J. Phys. Chem. 65, 1071 (1961).
302. Scheraga, H.A., in "The Proteins", Vol. 1, Neurath (redakteur), Academic Press, New York, (1963).
303. Schiller, R. en Otto, R., Chem. Ber. 9, 1637 (1876).
304. Schmidt, M., Österreich. Chem.-Zeit. 64, 236 (1963).
305. Schöberl, A., Textil-Praxis 14, 701 (1959).
306. Schöberl, A. en Eck, H., Ann. 522, 105 (1936).
307. Schöberl, A. en Gräfje, H., Ann. 617, 71 (1958).
308. Schöberl, A. en Langert, D., Deut. Tierartz. Wochenschr. 67, 590 (1960).
309. Schöberl, A. en Ludwig, E., Chem. Ber. 70B, 1422 (1937).
310. Schöberl, A. en Rambacher, P., Ann. 538, 84 (1939).
311. Schöberl, A. en Wagner, A., "Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie", Vol. 9, Thieme, Stuttgart, (1955).
312. Schöberl, A., Wagner, A., Melliand Textilber. 41, 984 (1960).
313. Schöberl, A., Tausent, H. en Gräfje, H., Angew. Chem. 68, 213 (1956).
314. Schönberg, A., Chem. Ber. 68B, 163 (1935).
315. Schönberg, A. en Barakat, M.Z., J. Chem. Soc. 892 (1949).
316. Schönberg, A. en Mostafa, A., J. Am. Chem. Soc. 73, 2401, (1951).
317. Schönberg, A., Rupp, E. en Gumlick, W., Chem. Ber. 66, 1932 (1933).
318. Schönberg, A., Stephenson, A., Kaltschmitt, H., Pettersen, E. en Schulten, H., Chem. Ber. 66, 237 (1933).

319. Schotte, L., Arkiv Kemi. 9, 361 (1956).
320. Schwartz, I.L., Rasmussen, H., Schloesser, M.A., Silver, L. en Fong, C.T.O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 46, 1288 (1960).
321. Scott, D.W., Finke, H.L., Gross, M.E., Guthrie, G.B. en Huffman, H.M., J. Am. Chem. Soc. 72, 2424 (1950).
322. Scott, D.W., Finke, H.L., McCullough, J.P., Gross, M.E., Pennington, R.E. en Waddington, G., J. Am. Chem. Soc. 74, 2478 (1952).
323. Sela, M., White, F.H. en Anfinsen, C.B., Biochim. Biophys. Acta 31, 417 (1959).
324. Seton, A.H., J. Am. Chem. Soc. 74, 4722, (1952).
325. Shirley, D.A. en Roussel, P.A., Science 113, 208 (1951).
326. Singh, B.B. en Ormerod, M.G., Nature 206, 1314 (1965).
327. Singh, B.B. en Ormerod, M.G., Biochim. Biophys. Acta 109, 204 (1965).
328. Singh, B.B. en Ormerod, M.G., Inst. J. Rad. Biol. 10, 369 (1966).
329. Stiles, S. en Stewart, J., J. Chem. Soc. 1792 (1921).
330. Smissman, E.E. en Sorenson, J.R.J., J. Org. Chem. 30, 4008 (1965).
331. Snow, N.S., Biochem. J. 84, 360 (1962).
332. Sörbo, B., Acta Chem. Scand. 12, 1990 (1958).
333. Spackman, D.H., Stein, W.H. en Moore, S., Anal. Chem. 30, 1190 (1958).
334. Spackman, D.H., Stein, W.H. en Moore, S., J. Biol. Chem. 235, 648 (1960).
335. Springell, P.H., Text. Res. J. 28, 874 (1958).
336. Stadtman, E.R. en Kornberg, A., J. Biol. Chem. 203, 47 (1953).
337. Stapleton, I.W. en Swan, J.M., Austl. J. Chem. 13, 416 (1960).
338. Stern, D.M. en Tobolsky, A.V., J. Chem. Phys. 14, 93 (1946).
339. Stevenson, D.P. en Beach, J.Y., J. Am. Chem. Soc. 60, 2872 (1938).
340. Stewart, T.D. en Donolly, L.H., J. Am. Chem. Soc. 54, 3559 (1932).
341. Straessle, R., J. Am. Chem. Soc. 76, 3138 (1954).
342. Stricks, I.W. en Kolthoff, I.M., J. Am. Chem. Soc. 73, 4569 (1951).
343. Stricks, I.W., Kolthoff, I.M. en Kapoor, R.C., J. Am. Chem. Soc. 77, 2057 (1955).
344. Sunner, S., Nature 176, 217 (1955).
345. Swan, J.M., Proc. Intern. Wool Text. Res. Conf. Austl. Vol. C, 25 (1955).

346. Swan, J.M., *Angew. Chem.* 68, 215 (1956).
347. Swan, J.M., *Austl. J. Chem.* 14, 69 (1961).
348. Swanepoel, O.A., D.Sc.-verhandeling, Universiteit O.V.S., (1963).
349. Swanepoel, O.A., *J.S. Afr. Chem. Inst.* 16, 48 (1963).
350. Swanepoel, O.A. en Louw, D.F., *J.S. Afr. Chem. Inst.* 16, 31 (1963).
351. Swanepoel, O.A. en van Rensburg, N.J.J., *Verrigt. 3^e Intern. Woltekstielkonf.*, afd. 2, bl. 133 (1965).
352. Sweetman, B.J., *Text. Res. J.*, 35, 774 (1965).
353. Tanaka, N., Kolthoff, I.M. en Stricks, W., *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2004 (1955).
354. Tanford, C., De, P.K. en Taggart, V.G., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 6028 (1960).
355. Tarbell, D.S., in "Organic Sulfur Compounds", Vol. 1, Kharasch (redakteur), Pergamon Press, New York, (1961).
356. Tarbell, D.S. en Harnish, D.P., *Chem. Revs.* 49, 1 (1951).
357. Thomas, R.C. en Reed, L.J., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6148 (1956).
358. Thompson, E.O.P. en O'Donnell, I.J., *Biochim. Biophys. Acta* 53, 447 (1961).
359. Tobolsky, A.V. en Baysal, B., *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1757 (1953).
360. Toennies, G., *J. Biol. Chem.* 120, 297 (1937).
361. Toennies, G., en Homiller, R., *J. Am. Chem. Soc.* 64, 3054 (1942).
362. Toennies, G. en Kolb, J.J., *Anal. Chem.* 23, 823 (1951).
363. Toussaint, J., *Bull. Soc. Chim. Belg.* 54, 319 (1945).
364. Van Wazer, J.R., "Phosphorus and its Compounds", Interscience Publish., New York, (1958).
365. Vaughan, M.C., Smith, R.P. en Gosselin, R.E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122, 50 (1966).
366. Walling, C. en Rabinowitz, R., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1137 (1959).
267. Walling, C. en Rabinowitz, R., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1243 (1959).
368. Walling, C., Basedow, O.H. en Savas, E.S., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2181 (1960).
369. Waters, W.A., "Free Radicals", Oxford Univ. Press, London, (1946).
370. Waugh, D.F., *Adv. Prot. Chem.* 9, 325 (1954).
371. Weigmann, H.D. en Rebenfeld, L., *Text. Res. J.* 36, 202 (1966).

372. Weitzman, P.D.J., Persoonlike mededeling aan Cecil; verwysing 54.
373. Weitzman, P.D.J., Biochim. Biophys. Acta 107, 146 (1965).
374. Westlake, H.E., Laquer, H.L. en Smyth, C.P., J. Am. Chem. Soc. 72, 436 (1950).
375. Wetlaufer, D.B., Adv. Prot. Chem. 17, 319 (1962).
376. Whitby, G.S. en Greenberg, H., Trans. Roy. Soc. Can. 23, 21 (1929).
377. White, F.H., J. Biol. Chem. 235, 383 (1960).
378. White, F.H., J. Biol. Chem. 236, 1353, (1961).
379. Whitney, R.B. en Calvin, M., J. Chem. Phys. 23, 1750 (1955).
380. Wieland, T. en Kawerau, E., Nature 168, 77 (1951).
381. Williams, E.J. en Forster, J.F., J. Am. Chem. Soc. 82, 3741 (1960).
382. Wolfram, L.J. en Speakman, J.B., Nature 187, 595 (1960).
383. Woodrow, C.C., Carmack, M. en Miller, J.G., J. Chem. Phys. 19, 951 (1951).
384. Wormell, R.L., Nature 163, 18 (1949).
385. Yakel, H.L. en Hughes, E.W., Acta Cryst. 7, 291 (1954).
386. Zahn, H., Chimia 15, 378 (1961).
387. Zahn, H., Gerthsen, T. en Meichelbeck, H., Melliand Textilber. 11, 1179 (1962).
388. Zahn, H., Kunitz, F.W. en Hildebrand, D., J. Text. Inst. 51, T740 (1960).
389. Zahn, H., Kunitz, F.W. en Meichelbeck, W., Inst. Text. France, Colloquim Struct. de la Laine, Parys, (1962).
-

DANKBETUIGINGS

Graag wil ek die volgende persone bedank:

Professor C.v.d.M. Brink, van wie ek 'n deeglike onderrig in chemie ontvang het, vir die voorreg om as student onder hom ingeskryf te mag wees.

Dr. O.A. Swanepoel wat as mede-studieleier opgetree het en deur wie se dinamiese invloed my navorsingsloopbaan gestimuleer is. Sy inspirerende leiding gedurende die ondersoek, sowel as die kritisering van die voorlopige manuskrip is opofferings wat baie op prys gestel word.

Die Direkteur van die Suid-Afrikaanse Woltekstiel-Navorsingsinstituut en die President van die W.N.N.R. vir toestemming om hierdie materiaal vir die doeleindes van 'n verhandeling te mag gebruik.

My kollegas aan die Suid-Afrikaanse Woltekstiel-Navorsingsinstituut vir hulle belangstelling en hulp.

