

## Zur Analyse der Hexonbasen.

Von

A. Kossel und A. J. Patten.

### I.

Die von A. Kossel und F. Kutscher<sup>1)</sup> benutzten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Hexonbasen haben seitdem eine mehrfache Anwendung und Nachprüfung erfahren. Hierbei hat sich herausgestellt, daß die Argininbestimmung eine ziemlich genaue ist, daß jedoch für das Lysin nur dann richtige Analysenzahlen gefunden werden, wenn man die Schwefelsäurespaltung der Eiweißkörper bei Gegenwart von löslichen anorganischen Salzen, z. B. Kochsalz, vornimmt. Versäumt man die Vorsicht, so kann man, wie Hart<sup>2)</sup> im hiesigen Laboratorium gezeigt hat, viel zu niedrige Werte erhalten.

Auch die Bestimmungsmethode des Histidins schien uns noch einer Verbesserung bedürftig zu sein. Das von A. Kossel und F. Kutscher angegebene Verfahren ist folgendes: Die durch Fällung mit Silbersalz bei Gegenwart überschüssigen Baryts erhaltene Mischung, welche das gesamte Arginin und Histidin neben einer geringen Menge unbekannter Stoffe (Asparaginsäure?) enthält, wird mit einer so großen Menge Silbernitrat versetzt, als zur Ausfällung von Arginin und Histidin bei Gegenwart überschüssigen Ätzbaryts nötig ist. Bei vorsichtigem Zusatz der Ätzbarylösung fällt zunächst das Histidin mit einigen geringfügigen Beimengungen aus, während das Arginin in Lösung bleibt.

Um das in diesem Silberniederschlag enthaltene Histidin von den Beimengungen zu befreien, wurde die nach Entfernung des Silbers erhaltene Masse bei Gegenwart eines geringen Überschusses von Salpetersäure mit Silbernitrat versetzt,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 165.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 347.

wobei das Histidin in Lösung bleibt, während die Beimengungen gefällt werden.

Dies Verfahren führt in den meisten Fällen zu guten Resultaten, hat aber den Nachteil, daß die Herstellung der richtigen Acidität, von welcher der Erfolg abhängig ist, auf subjektivem Ermessen beruht. Wir haben uns bemüht, diesen Übelstand durch Anwendung eines anderen Reinigungsverfahrens für das Histidin zu vermeiden. Unsere Modifikation beruht auf der Beobachtung, daß das Histidin durch Quecksilbersulfat auch bei Gegenwart einer gewissen Menge freier Schwefelsäure vollständig gefällt wird. Dieses von Hopkins und Cole<sup>1)</sup> zuerst zur Ausfällung des Tryptophans empfohlene Reagens hat sich an Stelle des von A. Kossel zuerst angegebenen Quecksilberchlorids<sup>2)</sup> als Fällungsmittel für das Histidin so gut bewährt, daß es seit einiger Zeit im hiesigen Laboratorium zur Darstellung dieser Base in ausgiebiger Weise benutzt wird.

Einige Versuche zeigten uns die Verwendbarkeit des Quecksilbersulfats zur Trennung des Histidins von anderen Spaltungsprodukten der Eiweißkörper.

*Trennung von Histidin und Arginin.* Wir lösten Arginincarbonat in 500 ccm fünfprozentiger Schwefelsäure und bestimmten in 10 ccm dieser Lösung den Stickstoff nach Kjeldahl. Die Menge desselben betrug 0,539 g. Zu dieser Lösung fügten wir etwa 0,5 g Histidin, ebenfalls in 5%iger Schwefelsäure gelöst, und sodann eine zur Ausfällung des Histidins ausreichende Menge Quecksilbersulfatlösung hinzu. Nachdem die Flüssigkeit über Nacht gestanden hatte, filtrierten wir den Niederschlag ab, wuschen ihn mit 5%iger Schwefelsäure aus und bestimmten den Stickstoff in dem eingedampften Filtrat. Derselbe betrug 0,544 g. Der Fehler betrug somit +0,004 g.

Bei dem oben erwähnten Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins kommt als Beimengung zu dem Niederschlag anscheinend vorwiegend die Asparaginsäure in Betracht. Wir haben daher einen Versuch angestellt, um das Quecksilbersulfat als Trennungsmittel für Histidin und Asparaginsäure zu prüfen. Der Versuch ergab auch hier einen ziemlich geringen Fehler.

1) Journ. of physiology, Bd. 27, S. 418.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 182.

*Trennung von Histidin und Asparaginsäure.* Etwa 5 g Asparaginsäure wurden in 250 ccm 2,5%iger Schwefelsäure aufgelöst. Eine Kjeldahl-Bestimmung ergab einen Stickstoffgehalt der Lösung von 0,0560 g. In dieser Flüssigkeit wurden ungefähr 0,5 g Histidin aufgelöst und sodann durch Quecksilbersulfatlösung gefällt. Der Niederschlag wurde nach fünfständigem Stehen abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Die Stickstoffbestimmung in dem passend eingedampften Filtrat ergab 0,0570 g N. Der Fehler betrug somit + 0,0010 g.

In gleicher Weise wird durch Quecksilbersulfat auch eine Trennung von andern Monoamidosäuren zu erzielen sein. Die Anwesenheit der durch Quecksilbersulfat fällbaren Produkte der Eiweißspaltung — Cystin und Tryptophan — ist in diesen Niederschlägen nicht zu erwarten, dieselben sind übrigens auch durch scharfe Reaktionen gekennzeichnet. Ein weiterer Beweis für die Brauchbarkeit dieses Verfahrens ergibt sich aus den unten mitgeteilten Analysen des Edestins, welche eine hinreichende Übereinstimmung mit den Histidinwerten zeigen, die nach der bisherigen Methode gewonnen sind.

Für die Trennung des Histidins vom Arginin ist nach unsern Erfahrungen die von A. Kossel und F. Kutscher angegebene Methode vorzuziehen, wir wenden das Quecksilbersulfat nur zur Reinigung des als Silberverbindung vom Arginin getrennten Histidins an. Die Verarbeitung des Histidin und Arginin enthaltenden, durch überschüssigen Baryt gefällten Silberniederschlags wird daher zunächst so ausgeführt, wie dies von A. Kossel und F. Kutscher in dieser Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 172 und 173 beschrieben ist; S. 173, Reihe 12 von oben ist folgende Vorschrift an die Stelle der bisherigen zu setzen:

Der argininfreie Silberniederschlag wird mit einer gemessenen Menge fünfprozentiger Schwefelsäure angerieben, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelsilber abfiltriert, der Niederschlag mit siedendem Wasser sorgfältig ausgewaschen. Die Flüssigkeit wird hierauf soweit eingengt, daß der Schwefelsäuregehalt  $2\frac{1}{2}\%$  beträgt, und mit einem nicht zu reichlichen Überschuß von Quecksilbersulfat gefällt.<sup>1)</sup>

1. Man bereitet die Quecksilbersulfatlösung, indem man 500 ccm 15 volumprozentiger Schwefelsäure erhitzt und 75 g Quecksilberoxyd in der heißen Flüssigkeit löst.

Der Niederschlag bleibt bis zum nächsten Tage stehen, wird sodann abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, in Wasser zerteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte und durch Eindampfen vom Schwefelwasserstoff befreite Flüssigkeit kann direkt zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl benutzt werden. Will man das Histidindichlorid als solches wägen, so fügt man Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaktion hinzu und befreit die Lösung sodann durch Kohlensäure vom Überschuß des Baryts. Man dampft jetzt zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit siedendem Wasser auf, filtriert vom Baryumcarbonat ab und dampft unter Zusatz von Salzsäure in gewogenem, hinreichend geräumigem Porzellantiegel ein. Der krystallisierte Rückstand wird im Vacuum (am besten bei 40°) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen und als Histidindichlorid in Rechnung gebracht.»

## II.

Die folgenden Bestimmungen der Hexonbasen im krystallisierten Edestin wurden mit Hilfe der neuen Modifikationen des Verfahrens von A. Kossel und F. Kutscher ausgeführt.

1. Um den Einfluß des Salzzusatzes bei der Spaltung zu prüfen, stellten wir zwei Spaltungsversuche bei demselben Edestinpräparat an. Im ersten Versuch (A) wurden ungefähr 60 g lufttrockenes Edestinsulfat mit einer Mischung von 180 g konz. Schwefelsäure und 360 ccm Wasser unter Zusatz von 15 g Kochsalz 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht, der zweite Versuch (B) wurde in gleicher Weise ohne Zusatz des Kochsalzes ausgeführt.

2. Das Abdestillieren des Ammoniaks wurde nicht wie früher bei Gegenwart von Magnesia, sondern unter Zusatz von Baryumcarbonat vorgenommen.

3. Bei der Bestimmung des Histidins wurden in den Versuchen A und B die früheren Angaben von A. Kossel und F. Kutscher benutzt. Außerdem wurden 40 g Edestinsulfat mit Schwefelsäure und Kochsalz in demselben Verhältnis wie bei Versuch A zersetzt und das Histidin nach dem

oben beschriebenen Verfahren mit Quecksilbersulfat gereinigt. Dieser Versuch ist als Versuch C bezeichnet. Hierbei ergab sich in Versuch C eine vollständige Krystallisation des Histidins, während bei A und B auch nach langem Stehen noch eine gewisse Menge Mutterlauge neben den Krystallen des Histidinchlorids vorhanden war.

4. Als «Huminstickstoff a)» wurde der Stickstoff der im ersten Barytniederschlag zurückgebliebenen und durch Auskochen nicht zu entfernenden Substanz bezeichnet, als «Huminstickstoff b)» der Stickstoff der durch Silber niedergeschlagenen und später im Schwefelsilber zurückbleibenden Substanz. Über die Natur dieser Substanzen soll mit dieser Bezeichnung kein Urteil ausgesprochen werden.

Die Resultate dieser Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

		Stickstoff in		Prozente des	
		g		Gesamtstickstoffs	
Gesamtmenge des Stickstoffs	A)	9,999	—	100	—
	B)	9,926	—	100	—
	C)	6,587	—	100	—
Basenstickstoff	A)	3,795	—	37,9	—
	B)	3,514	—	35,4	—
Ammoniak-Stickstoff	A)	—	0,792	—	7,9
	B)	—	0,508	—	5,1
Stickstoff des Histidins	A)	—	0,353	—	3,5
	B)	—	0,311	—	3,14
	C)	—	0,207	—	3,14
» Arginins	A)	—	2,474	—	24,7
	B)	—	2,524	—	25,4
» Lysins	A)	—	0,176	—	1,76
	B)	—	0,171	—	1,72
Huminstickstoff (Gesamt)	A)	0,63	—	6,3	—
	B)	1,64	—	16,5	—
Huminstickstoff a) (Barytniederschl.)	A)	—	0	—	0
	B)	—	0,697	—	7,0
Huminstickstoff b) (Silberniederschl.)	A)	—	0,63	—	6,3
	B)	—	0,94	—	9,4

Das untersuchte Edestinpräparat enthielt, bei 110° getrocknet, nach Maßgabe der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 18,17% N. Auf Grundlage dieser Zahl lassen sich die prozentischen Mengen der Zersetzungsprodukte, bezogen auf das bei 110° getrocknete Edestinsulfat, folgendermaßen berechnen.

			Ge-	Prozen-
			wichts-	tische
			mengen	Mengen
Gesamtmenge des Edestins	A)		55,03	100
»	B)		54,6	100
»	C)		36,2	100
Ammoniak	A)		0,961	1,74
	B)		0,617	1,13
Histidin	A)		1,30	2,36
	B)		1,148	2,10
	C)		0,762	2,10
Arginin	A)		7,686	13,97
	B)		7,841	14,36
Lysin	A)		0,918	1,67
	B)		0,890	1,63

Die Versuche ergeben in Übereinstimmung mit den früheren Angaben Harts, daß die Menge des Ammoniaks durch den Zusatz des Kochsalzes vermehrt, hingegen die des «Huminstickstoffs» vermindert wird. Der Huminstickstoff a war sogar bei dem Versuch A überhaupt nicht nachweisbar. Hart hatte ferner nach Einwirkung von Schwefelsäure bei Gegenwart von Kochsalz bei dem Casein eine sehr beträchtliche, beim Leim eine geringe Vermehrung des Lysins gefunden. Beim Edestin hatte der Zusatz des Kochsalzes in unseren Versuchen keinen Einfluß auf die Lysinbestimmung ausgeübt. Man kann hiernach vermuten, daß dieser Einfluß sich umso mehr geltend macht, je größer die Ausbeute an Lysin ist, und daß bei lysinarmen Eiweißkörpern auch ohne Salzzusatz richtige Zahlen gefunden werden.

Ein Vergleich unserer Resultate mit denen von E. Schulze und E. Winterstein<sup>1)</sup> sowie von Abderhalden<sup>2)</sup> ergibt folgendes:

Prozente des Edestins.

	Schulze und Winterstein	Abderhalden	Kossel und Patten
Histidin	1,35	1,1	2,36
	0,98		2,10
Arginin	10,7	11,7	13,97
	11,2		14,36
Lysin	1,09	1,0	1,67
	1,55		1,63

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 547.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXXVII, S. 499.