

Über eine Verbesserung der Methode zur Bestimmung des Stickstoffes in Aminosäuren.¹⁾

Von

Vladimir Staněk.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Untersuchungsstation für Zuckerindustrie in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. September 1905.)

Die Bestimmung der Aminosäuren bildete von jeher eine schwache Seite der Analyse pflanzlicher und tierischer Produkte. Es fehlt nämlich an einem Reagens, welches eine quantitative Abscheidung und Trennung der erwähnten Säuren von anderen Begleitstoffen ermöglichen würde. Wohl liefern manche Aminosäuren unlösliche Kupfer- und Quecksilbersalze, doch lassen sich dieselben nicht vorteilhaft anwenden, da erstere sich nur sehr langsam, und wenn die Lösung unrein ist, überhaupt nicht abscheiden, die zweiten wieder sich leicht im Überschusse des Reagens lösen. Dazu fällen Quecksilbersalze eine ganze Reihe anderer stickstoffhaltiger Substanzen.

Es erübrigen also zur Bestimmung der Aminosäuren nur präparative Methoden,²⁾ und solche, die auf der Gruppenreaktion der Aminosäuren mit der salpetrigen Säure beruhen, wobei sich der Stickstoff aus beiden, an der Reaktion beteiligten Säuren entwickelt.

Es ist klar, daß diese Methoden keine vollkommen richtigen Resultate liefern können, da ja auch andere stickstoffhaltige Substanzen mit der salpetrigen Säure unter Stickstoffentwicklung reagieren; es sei hier nur z. B. auf Ammoniumsalze, Eiweiß-

¹⁾ Vorgelegt den 19. November 1904 der böhmischen Akademie für Wissenschaften.

²⁾ Scheibler, Zeitschrift für Chemie 1866, S. 278; Fischer und Bergell, Berl. Ber., Bd. XXXV, S. 3779; K. Andrlík, Zeitschrift für Zuckerindustrie in Böhmen, 1903, S. 665.

stoffe, Peptone, Guanin u. a. hingewiesen. Wenn sich nun auch einige von diesen (Ammoniak, Eiweiß) vorher entfernen lassen, so muß man andere notgedrungen mit in den Kauf nehmen, solange keine bessere Methode existiert.

Die Bestimmung von Aminosäuren durch Zersetzung mittels salpetriger Säure haben ursprünglich Sachse und Korman¹⁾ ausgearbeitet.

Die Lösung, in welcher die Aminosäuren bestimmt werden sollten, wurde in ein Gefäß gebracht, welches mit einer Lösung von salpetriger Säure gefüllt war: das sich entwickelnde Gas wurde in einer Eisensulfatlösung von Stickoxyden befreit, dann das Volumen des Stickstoffes gemessen und auf den Stickstoff der Aminosäure umgerechnet.

Diese Methode wurde zahlreichen Modifikationen unterworfen: so benützten Sachse und Korman²⁾ selbst statt der salpetrigen Säure das Kalisalz derselben, indem sie dieses im Entwicklungskolben in Gegenwart der Aminosäure mittels Schwefelsäure zersetzten.

Ker³⁾ verdrängt die Luft und nach der Reaktion den Stickstoff aus dem Apparate durch Kohlensäure.

Böhmer⁴⁾ empfiehlt für die Absorption der Stickoxyde die besonders vorteilhafte Lösung von Permanganat in Alkalilauge.

Alle hier angeführten Modifikationen haben den gemeinsamen Nachteil, daß man mit freier salpetriger Säure operieren muß, die schon bei gewöhnlicher Temperatur rasch unter Entwicklung von Stickstoffdioxyd zerfällt. Da sich nun eine ziemlich bedeutende Menge dieses Gases, 200—300 ccm, neben relativ geringen Mengen Stickstoff bildet, so ist die Arbeit mit einem so großen Volumen Gas unbequem. Außerdem verläuft die Reaktion mit der salpetrigen Säure nicht immer vollkommen glatt, denn ich machte die Beobachtung, daß manchmal (besonders in Gegenwart starker Säuren) bis $\frac{1}{3}$ aller Amidosäuren der Reaktion entging.

¹⁾ Landw. Versuchstation, Bd. XVII, S. 95.

²⁾ Landw. Versuchstation, Bd. XVII, S. 321.

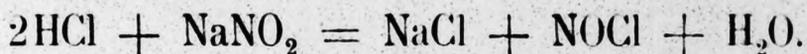
³⁾ Landw. Versuchstation, Bd. XXIV, S. 365.

⁴⁾ Landw. Versuchstation, Bd. XXIX, S. 247.

Ich versuchte also die salpetrige Säure durch eine andere Substanz zu ersetzen, die beständiger und frei von den angeführten Nachteilen wäre.

Aus den Arbeiten von Curtius,¹⁾ Jochem²⁾ und Tilden³⁾ ist bekannt, daß durch Einwirkung von salpetrigsaurem Natron auf eine salzsaure Lösung der Aminosäure die entsprechende chlorierte Säure entsteht und der Stickstoff sich als solcher abspaltet.

Diese Reaktion nun benützte ich für quantitative Zwecke. Das Zutropfen einer konzentrierten Lösung von salpetrigsaurem Natron in die Flüssigkeit, welche die Aminosäure und Salzsäure enthielt, führte nicht zum Ziele, da sich die Flüssigkeiten erwärmen und große Mengen von Stickstoffdioxyd entstehen. Ich mußte deshalb von dieser Arbeitsweise abgehen und benützte nun zur Zerlegung der Aminosäuren eine Lösung, die durch Einwirkung von salpetrigsaurem Natron auf rauchende Salzsäure entsteht und wahrscheinlich Nitrosylchlorid enthält nach der Reaktionsgleichung:



Bei der Darstellung gehe ich folgendermaßen vor: Ein bestimmtes Volumen konzentrierter Salzsäure wird in ein walzenförmiges Glas abgemessen und mit einem Tropftrichter, dessen Röhre bis an den Boden reicht und zu einer feinen Spitze ausgezogen ist, abgeschlossen. In den Trichter gießt man $1,5$ Volumen der angewendeten Salzsäure von 40% iger wässriger Lösung von salpetrigsaurem Natron und läßt dieselbe in die Säure tropfen. Es findet eine energische Gasentwicklung statt und die Lösung färbt sich orangerot. Nach beendigter Reaktion gießt man die orangerote Flüssigkeit von dem abgeschiedenen Kochsalze ab und bewahrt dieselbe in einer gut verschließbaren Flasche. Die so bereitete Lösung ist ziemlich beständig: sie entwickelt in der Kälte nur sehr langsam Stickoxyde und läßt sich mehrere Tage lang aufbewahren; mit kaltem Wasser verdünnt, färbt sie sich grünlich und das Stickstoffdioxyd entweicht. Mit gesättigter saurer Lösung von Kochsalz läßt sie sich ohne Zerfall

¹⁾ Berl. Ber., Bd. XVI, S. 744.

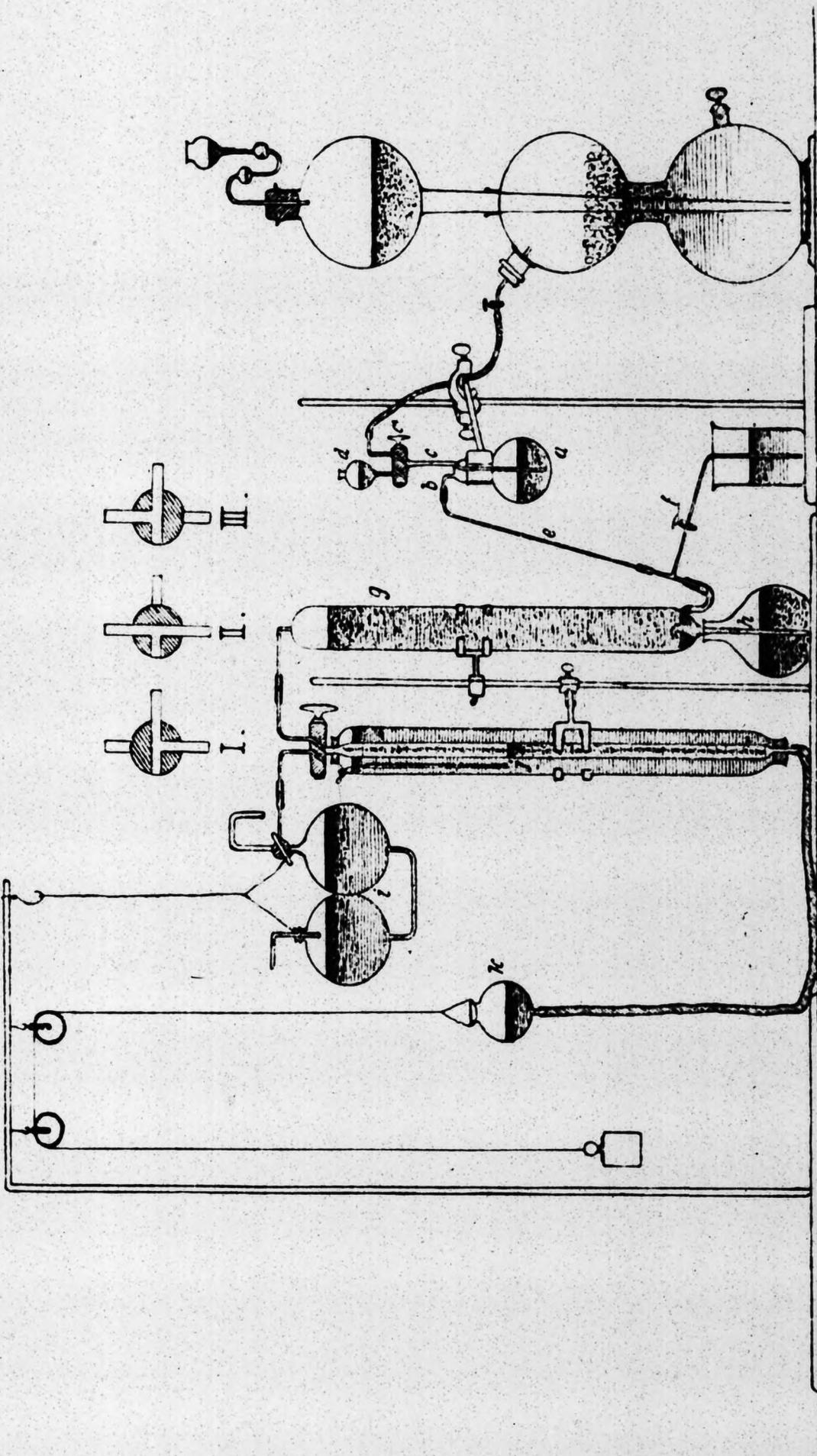
²⁾ Diese Zeitschrift 1901, S. 119.

³⁾ Berl. Ber., Bd. XXVIII, S. 646.

verdünnen, man muß also dafür sorgen, daß die Reaktionsflüssigkeit mit Chlornatrium gesättigt sei.

Durch dieses Reagens werden die Aminosäuren glatt und rasch zerlegt, die Reaktion ist sicher nach ca. 30 Minuten beendet. Bei der Reaktion entsteht keine große Menge an Stickstoffoxyd. Blinde Versuche ohne Aminosäuren und in Gegenwart organischer Stoffe, wie Zucker, zeigten, daß etwa 15—20 ccm dieses Gases entstehen; der bei dem Zerfall der Aminosäuren entstehende Stickstoff reißt wohl etwas mehr N_2O_2 mit, doch übersteigt seine Menge nie 40—50 ccm. Die Zerlegung der Aminosäuren, das Reinigen und Messen des Stickstoffes führte ich im umstehenden Apparate aus.

Der Zersetzungskolben *a*, etwa 80 ccm fassend, ist mit eingeschliffenem Glasstöpsel verschlossen, in welchem zwei Röhren eingeschmolzen sind. Die eine Röhre *b* am obersten Ende dient zum Ableiten der Gase, die zweite *c* reicht bis zu $\frac{2}{3}$ der Höhe des Kolbens herab und ist mit einem doppeltgebohrten Hahn *c'* versehen, welcher ermöglicht, einerseits die Verbindung mit einem Kippschen Kohlensäureapparate, andererseits mit dem Trichter *d* herzustellen. Die Röhre *b* ist mittels eines dickwandigen Kautschukrohres mit der starkwandigen, nach unten umgebogenen Röhre *e* verbunden, die zum Absorber *g* führt und mit einem seitlichen Hahn *f* versehen ist, der in einem mit Wasser gefüllten Becherglase mündet. In den Absorber *g* ist unten eine angebogene Röhre *h* so eingeschmolzen, daß eine ringförmige Vertiefung entsteht, die mit Quecksilber gefüllt wird; das Ende der Röhre reicht in einen mit Lauge gefüllten Kolben. Der Absorber geht oben in eine enge Kapillare über, welche die Verbindung mit der Bürette *j* ist. Diese ist mit Wasser gefüllt und unten durch einen Kautschukschlauch mit dem Gefäße *k* zur Ausgleichung des Druckes verbunden; dieses ist zur bequemen Handhabung an einer Schnur aufgehängt, die über Rollen läuft und mit einem Gegengewicht versehen ist. Durch Senken und Heben des Gefäßes überführen wir das Gas in die Bürette usw. Die Bürette ist mit einem Wassermantel versehen, in welchem ein Thermometer hängt. Der Zweiweghahn der Bürette kommuniziert einerseits mit dem Ab-



sorber *g*, andererseits mit einem zweiten Absorber *i*, der mit etwa 300 ccm gesättigter Kaliumpermanganatlösung in ca. 10%iger Alkalilauge gefüllt ist. Der Doppelweghahn *g* des Absorbers erlaubt die Verbindung desselben mit der Bürette (I) oder mit der Außenluft (II) oder auch der Bürette mit der Luft (III).

Den beschriebenen Apparat¹⁾ verwende ich mit Vorteil zur Bestimmung des Stickstoffes in Nitraten nach der Methode von Schulze-Tieman, sowie des Stickstoffes nach Dumas. Im letzteren Falle wird der Zersetzungskolben direkt durch das Verbrennungsrohr ersetzt und der Absorber *i* fällt weg.

Die Bestimmung der Aminosäuren wird folgendermaßen ausgeführt: In den Kolben (*a*) werden ca. 4–5 g Kochsalz und 25 ccm der Lösung, die 0,05–0,3 g Aminosäure enthält, eingeführt, der Kolben dann mittels des mit Vaseline ein wenig geschmierten Glasstöpsels geschlossen und Kohlensäure durchgeleitet. (Dazu eignet sich nicht die Kohlensäure aus der Bombe, da sie viel Luft enthält. Dafür kann man aus reinem Marmor Kohlensäure, die nur etwa 0,1–0,2% anderer Gase enthält, gewinnen, wenn man den Kippschen Apparat Tags vorher füllt und zeitweise etwas von der Kohlensäure ausläßt.)

Nach dem Öffnen der Hähne *c'* und *f* lassen wir ca. 5 Minuten Kohlendioxyd hindurchstreichen und prüfen dann, ob schon alle Luft verdrängt ist, indem wir den Hahn *f* schließen und in raschem Strome etwa 30 ccm Gas in den Absorber einlassen: wird alles bis auf ein kleines Bläschen absorbiert, so lassen wir aus dem Trichter *d* etwa 40 ccm der Nitrosylchloridlösung in den Kolben und lassen unter öfterem Schütteln reagieren. Auf vollständiges Aufhören der Gasentwicklung braucht man nicht zu warten, sondern man läßt nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde aus dem Trichter *d* gesättigte Kochsalzlösung mit etwas Nitrosylchlorid einfließen, bis das Gas vollkommen verdrängt und etwas von der Flüssigkeit bis zum Absorber gelangt. Dann verbinden wir den Absorber *g* mit der Bürette, durch Senken der Füllkugel saugen wir das Gas in die Bürette und leiten dasselbe sogleich in den zweiten Absorber, der vordem vollkommen mit Flüssigkeit gefüllt worden war. In diesem schütteln wir das Gas so

¹⁾ Von der Firma Huněk, Prag.

lange, bis aller N_2O_2 absorbiert ist. (Das Ende der Reaktion erkennen wir daran, daß die rote Permanganatlösung an den Glaswänden ihre Farbe in grün umwandelt, sofern noch eine Spur von Stickstoffoxyd vorhanden ist. Eine Füllung des Absorbers reicht für ca. 10 Versuche aus.) Sodann saugen wir das Gas wieder in die Bürette, warten, bis die Temperatur des Gases sich ausgeglichen hat, und lesen sein Volumen nach Ausgleichung des Druckes ab. Da sich der Stickstoff sowohl aus der Aminosäure als auch aus dem Nitrosylchlorid abspaltet, entspricht die Hälfte des abgegebenen Volumens dem Stickstoff der Aminosäure. Zur Überführung des Gasvolumens auf Gewicht benützt man die Tafel von Dietrich.

Nach der beschriebenen Methode wurde der Stickstoff in den gewöhnlichen Aminosäuren mit folgendem Erfolge bestimmt:

| Substanz | Substanz mg | Stickstoff mg | Gas ccm | Druck mm | Temperatur ° C. | Gefunden den N_2 mg | Differenz mg | Theorie % N | Gefunden % N |
|---------------|----------------|------------------|------------|-------------|--------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Glykokoll | 50 | 9,35 | 17,0 | 744 | 22 | 9,42 | + 0,07 | 18,7 | 18,84 |
| | 100 | 18,70 | 33,7 | 738 | 20 | 18,70 | — | 18,7 | 18,70 |
| | 100 | 18,70 | 33,0 | 745 | 20 | 18,52 | — 0,17 | 18,7 | 18,52 |
| | 100 | 18,70 | 32,7 | 746 | 24 | 18,00 | — 0,70 | 18,7 | 18,00 |
| Leucin | 200 | 21,41 | 38,3 | 743 | 23 | 21,12 | — 0,29 | 10,71 | 10,56 |
| | 50 | 5,35 | 9,6 | 744 | 22 | 5,27 | — 0,08 | | 10,53 |
| | 250 | 26,76 | 48,2 | 744 | 23 | 26,57 | — 0,19 | | 10,63 |
| | 100 | 10,71 | 19,0 | 744 | 24 | 10,84 | + 0,13 | | 10,84 |
| Tyrosin | 100 | 7,74 | 14,4 | 743 | 22 | 7,98 | + 0,24 | 7,74 | 7,98 |
| | 200 | 15,48 | 27,0 | 744 | 23 | 14,88 | + 0,40 | | 7,44 |
| | 300 | 23,22 | 44,4 | 744 | 22 | 24,60 | + 1,38 | | 8,20 |
| Glutaminsäure | 50 | 4,76 | 8,6 | 743 | 21 | 4,79 | + 0,03 | 9,52 | 9,58 |
| | 100 | 9,52 | 16,5 | 744 | 22 | 9,13 | — 0,39 | | 9,13 |
| | 100 | 9,52 | 18,0 | 744 | 22 | 9,98 | + 0,46 | | 9,98 |
| | 200 | 19,04 | 33,6 | 747 | 20 | 18,96 | — 0,08 | | 9,48 |
| | 150 | 14,28 | 25,6 | 744 | 21 | 14,25 | — 0,08 | | 9,49 |
| | 250 | 23,80 | 43,0 | 744 | 23 | 23,71 | — 0,09 | | 9,48 |
| 300 | 28,56 | 50,2 | 743 | 23 | 27,68 | — 0,88 | 9,23 | | |

| Sub- stanz | Sub- stanz mg | Stick- stoff mg | Gas ccm | Druck mm | Tem- peratur ° C. | Gefun- den N ₂ mg | Diffe- renz mg | Theorie ‰ N | Gefun- den ‰ N |
|---------------------|---------------------|-----------------------|------------|-------------|-------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------|----------------------|
| Aspara- ginsäure | 50 | 5,27 | 9,5 | 743 | 23 | 5,24 | - 0,03 | 10,54 | 10,48 |
| | 100 | 10,54 | 18,5 | 744 | 22 | 10,25 | - 0,29 | | 10,28 |
| | 150 | 15,80 | 29,5 | 741 | 23 | 16,14 | + 0,34 | | 10,76 |
| | 200 | 21,08 | 36,7 | 747 | 19 | 20,76 | - 0,32 | | 10,38 |
| | 250 | 26,34 | 45,2 | 741 | 21 | 25,07 | - 1,27 | | 10,28 |

Die angeführten Ergebnisse sind ganz befriedigend. Die weitere Aufgabe war, zu bestimmen, ob und in welchem Maße auch andere stickstoffhaltige Substanzen durch Nitrosylchlorid Stickstoff abspalten.

Die abgewogenen Mengen an Substanz wurden in 25 ccm gesättigter Kochsalzlösung gelöst oder suspendiert und dann wie bei den Aminosäuren vorgegangen. Die Ergebnisse waren folgende:

| Substanz | mg | Stickstoff und Substanz mg | Gas ccm | Druck mm | Tem- peratur ° C. | N abge- spalten mg |
|------------------------|------|-------------------------------------|------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| Betain | 1000 | 104,6 | 0,5 | 746 | 20 | 0,28 |
| Asparagin | 100 | 21,18 | 25,8 | 746 | 23 | 14,26 |
| Ammoniumsulfat . . . | 100 | 21,23 | 8,70 | 746 | 23 | 9,5 |
| Pepton | 200 | 26,31 | 9,0 | 741 | 25 | 4,88 |
| Gelatine | 1000 | 120,30 | 21,5 | 746 | 25 | 11,73 |
| Harnstoff | 100 | 46,70 | 50,3 | 746 | 24 | 27,66 |
| Hydrazinsulfat | 100 | 21,56 | 33,0 | 746 | 25 | 12,35 |
| Cinchonin | 100 | 9,46 | 0,8 | 746 | 26 | 0,43 |
| Cocainchlorhydrat . . | 100 | 3,83 | 0,4 | 744 | 26 | 0,22 |
| Nicotin | 200 | 34,56 | 1,0 | 746 | 26 | 0,54 |
| Piperin | 100 | 4,92 | 0,5 | 742 | 25 | 0,27 |

Endlich blieb noch übrig, zu erforschen, wie sich gewisse Stoffe, die frei von Stickstoff sind, bei der Bestimmung der Aminosäuren verhalten. Es wurde einerseits die direkte Einwirkung von

Nitrosylchlorid auf die erwähnten Stoffe untersucht, andererseits eine Bestimmung von Aminosäuren in ihrer Gegenwart ausgeführt. Die Resultate waren folgende:

| Substanz g | Aminosäure mg | Stickstoff- gehalt mg | Gas ccm | Druck mm | Tem- pera- tur ° C. | N ₂ mg | Diffe- renz mg |
|----------------|--|-----------------------------|------------|-------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
| 2,5 Saccharose | — | — | 0,2 | 740 | 25 | 0,11 | — |
| 7 » | 200 Asparagin | 21,08 | 39,0 | 744 | 23 | 21,54 | + 0,46 |
| 10 » | 200 » | 21,08 | 38,3 | 745 | 24 | 21,07 | — 0,01 |
| 10 » | 100 » | 10,54 | 18,2 | 746 | 24 | 10,01 | — 0,53 |
| 10 » | 100 Glutaminsäure | 9,52 | 17,8 | 746 | 23 | 9,84 | + 0,32 |
| 10 » | 200 » | 19,04 | 34,0 | 746 | 22 | 18,90 | — 0,14 |
| 10 » | 200 Leucin | 21,48 | 38,5 | 746 | 22 | 21,40 | — 0,08 |
| 10 » | 100 » | 10,74 | 18,5 | 746 | 24 | 10,16 | — 0,58 |
| 1 Ameisensäure | — | — | 0,3 | 740 | 20 | 0,17 | — |
| 1 » | 200 Glutaminsäure | 19,04 | 35,0 | 744 | 25 | 19,12 | + 0,08 |
| 1 Milchsäure | — | — | 0,6 | 741 | 26 | 0,30 | — |
| 1 » | 100 Leucin | 10,74 | 19,2 | 744 | 25 | 10,46 | — 0,28 |
| 1 Oxalsäure | — | — | 0,3 | 744 | 23 | — | — |
| 1 » | 200 Asparaginsäure | 21,08 | 37,2 | 744 | 23 | 20,67 | — 0,41 |
| 1 Essigsäure | } 200 Asparaginsäure 100 Glycocoll 100 Glutaminsäure | 21,08 | 36,3 | 744 | 23 | 20,01 | — 1,07 |
| 1 Milchsäure | | 18,70 | 35,2 | 740 | 23 | 19,36 | + 0,66 |
| 1 Oxalsäure | | 9,54 | 17,5 | 744 | 26 | 9,52 | — 0,02 |
| 1 Ameisensäure | | | | | | | |

Aus den angeführten Zahlen ist zu ersehen, daß die erwähnten Substanzen keinen nennenswerten Einfluß auf die Genauigkeit der Bestimmung haben. Es wird also möglich sein, nach dieser Methode die Aminosäuren bei den verschiedenen Reaktionen, ja selbst in den Zersetzungsprodukten des Eiweißes usw. zu verfolgen, und es erübrigt nur noch, die Einwirkung von Nitrosylchlorid auf Hexonbasen, die bei der Hydrolyse ebenfalls entstehen, zu studieren. Ich will versuchen, diese Frage zu lösen, sobald das notwendige Material gewonnen sein wird. Auch ist noch notwendig, zu prüfen, inwieweit sich diese Methode zur Bestimmung der Aminosäuren in pflanzlichen

und tierischen Produkten, sowie in verschiedenen technischen Erzeugnissen eignet.

Unterdessen ist es mir gelungen, diese Methode auf die Bestimmung von Aminosäuren im Harn anwendbar zu machen, worüber in einer besonderen Arbeit «Eine chemisch-physiologische Studie über Betain» (Berichte der böhm. Akademie, Bd. XIII, S. 22) berichtet wurde.

Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß die von Tilden entdeckte Reaktion von Nitrosylchlorid auf Aminosäure zur quantitativen Bestimmung der letzteren verwendet werden kann. Es wurde ein Apparat beschrieben, welcher ein bequemes Auffangen, Reinigen und Messen des abgespaltenen Stickstoffes ermöglicht, und die geeignetsten Bedingungen aufgesucht, sowie der Einfluß verschiedener Stoffe auf die Genauigkeit der Bestimmung geprüft.
