

Über die titrimetrische Bestimmung des Histidins und anderer Imidazolderivate.

Von

Dr. C. L. Lautenschläger.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 15. August 1917.)

A. Einleitung	Seite 226.
B. Titrierverfahren mit Silberlösung	» 230.
C. Titrierverfahren mit p-Diazobenzolsulfosäure	» 232.
D. Titrierverfahren mit Titan	» 233.
E. Hinderung durch beigemischte Substanzen	» 236.
F. Isolierung der Histidinfraktion aus Proteinen	» 240.
G. Ergebnisse der Untersuchung von Proteinen	» 242.

A. Einleitung.

Die gesonderte Stellung welche das Histidin als Imidazolderivat unter den Bausteinen der Proteinstoffe einnimmt, regt zu Aufsuchungen von Reaktionen an, welche eine bequeme und sichere titrimetrische Bestimmung dieses Körpers und damit das Studium seines physiologischen Verhaltens und seiner Rolle im Stoffwechsel der Tiere und Pflanzen ermöglichen. Die bisherigen geübten Bestimmungsmethoden beruhen auf der Gewinnung einer «Histidinfraktion», in welcher entweder das Histidin durch Kjeldahl-Bestimmung ermittelt wird, oder aus welcher das Histidin als schwerlösliches Pikrolonat krystallinisch dargestellt und gewichtsanalytisch bestimmt wird. Erstere ergibt eine Maximalbestimmung, letztere in den meisten Fällen eine Minimalbestimmung.

Für die Ausarbeitung eines titrimetrischen Verfahrens schienen zwei Reaktionen des Histidins besonders bemerkenswert: Erstens die Bildung von Silbersalzen und zweitens die Bildung von Azo-Farbstoffen. Die erstere Reaktion liegt ja

schon den üblichen quantitativen Bestimmungsmethoden zugrunde, die zweite findet zum qualitativen Nachweis des Histidins ausgedehnte Anwendung.

Meine Untersuchungen mußten vorzeitig unterbrochen werden und bedürfen in mancher Beziehung noch einer weiteren Fortführung und Ergänzung. Ich halte aber die Mitteilung der bisher gewonnenen Ergebnisse um so mehr für angemessen, da sich die von mir geprüften Methoden auch auf andere Körpergruppen, z. B. gewisse Purinderivate anwenden lassen.

Wallach und seine Schüler Rung und Behrend wiesen im Jahre 1886 nach,¹⁾ daß die Imidazolkörper mit Diazolösungen zu kuppeln imstande sind. Pauly,²⁾ welcher das Histidin als Imidazolderivat erkannte, stellte fest, daß diese Farbstoffbildung auch beim Histidin eintritt, und fand damit ein wertvolles Hilfsmittel für die Untersuchungen über die chemische und physiologische Bedeutung dieses Proteinbausteins.

Ich versuchte diese Reaktion in dreierlei Weise zur titrimetrischen Bestimmung des Histidins zu verwenden.

Verfahren I (Silberverfahren). Das erste Verfahren (s. unter B) beruht darauf, daß man zu der neutralen Lösung, deren Histidingehalt bestimmt werden soll, Silbernitratlösung von bekanntem Gehalt aus einer Bürette hinzutropfen läßt, bis eine Tüpfelprobe mit einer sodaalkalischen Lösung von p-Diazobenzolsulfosäure keine Rotfärbung mehr ergibt. Da nur die freie Base mit Diazokörpern unter Bildung von Farbstoffen reagiert, während die Silbersalze keine Farbenreaktionen geben, so kann der Endpunkt der Titration an dem Ausbleiben der Rotfärbung erkannt werden.

Auf diese Weise konnten auch Imidazol selbst und ferner die Salze und Ester des Histidins quantitativ bestimmt werden. Aus den Analyseergebnissen, welche weiter unten angeführt werden, ergab sich, daß je ein Mol Imidazol einem Silberatom entspricht; ein Mol freies Histidin verbraucht zwei Atome Silber, ein Mol Histidin-Methylester 3 Atome Silber.

¹⁾ Rung und Behrend, Ann. Chem., Bd. 271, S. 28 (1886).

²⁾ Pauly, Diese Zeitschr., Bd. 42, S. 508.

Diese Titrationsmethode läßt sich jedoch nur dann verwenden, wenn Histidin in reinem Zustande in Lösung vorhanden ist, da andere Aminosäuren sich ebenfalls mit Silber umsetzen. Dies konnte festgestellt werden, indem die Histidinlösung vor der Titration mit molekularen Mengen von Glykokoll, Alanin und Arginin versetzt wurde (s. u.).

Die Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung des Histidins ist also eine beschränkte. Es ist aber bemerkenswert, daß auch andere mit Diazolösung kuppelnde Körper (Guanin, Adenin, Theophyllin) nach diesem Prinzip titrimetrisch ziemlich genau bestimmt werden können.

Verfahren II (Titration mit Diazolösung). Das zweite Verfahren (s. unten C) beruht auf der Anwendung einer Diazolösung von bekanntem Wirkungswert, und zwar p-Diazobenzol-sulfosäure, als Titrationsflüssigkeit. Man fügt diese Lösung zu der zu untersuchenden Histidinlösung hinzu, indem man Tüpfelproben mit einer Farbstoffkomponente anstellt, die einen dunkleren Farbenton ergibt als die Histidinverbindung. Eine solche ist das technische «K-Salz» oder «H-Salz», welche mit den Diazokomponenten tiefviolette Farbstoffe bilden. Ein geringer Überschuß an Diazolösung macht sich mithin durch den veränderten Farbenton der Tüpfelprobe kenntlich. Aus der Menge der verbrauchten Diazolösung ergibt sich die Menge des Histidins, vorausgesetzt, daß man das Verhältnis kennt, in welchem sich die beiden Farbstoffkomponenten vereinigen. Mit dieser Methode werden nur annähernde Ergebnisse erzielt, sie kommt daher als Notbehelf nur in solchen Fällen in Betracht, in denen Methode I oder III auf Schwierigkeiten stößt.

Verfahren III (Titanverfahren). Das dritte Verfahren (s. unter D) beruht auf einer von Knecht und Hibbert¹⁾ für die quantitative Bestimmung von Azoverbindungen ausgearbeiteten Methode, welche bei der Anwendung auf Histidin nach folgendem Prinzip ausgeführt wird. Man fügt zu der Lösung, in welcher man das Histidin bestimmen will, die Diazolösung im Überschuß hinzu, sodaß das Histidin völlig unter Farbstoff-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 1552.

bildung umgewandelt wird. Die überschüssige Diazolösung wird sodann durch Alkohol in der Siedehitze zersetzt, während der gebildete Farbstoff unverändert bleibt. Zur Ermittlung der Farbstoffmenge dient die oxydierende Wirkung, welche der Farbstoff in der Siedehitze auf eine Lösung von Titantrichlorid von bekanntem Gehalt ausübt. Diese wird hierbei zu Titantrichlorid oxydiert, aus der titrimetrisch ermittelten Menge des oxydierten Titans ergibt sich die Menge des Farbstoffs, somit auch die Menge der Farbstoffkomponenten — in diesem Falle des Histidins, Imidazols usw. Natürlich ist es auch in diesem Falle nötig, das Verbindungsverhältnis der beiden Farbstoffkomponenten zu kennen. Dieses ist bei verschiedenen Diazokörpern ein verschiedenes. Pauly (l. c.) hat die Einwirkung der Diazobenzolarsinsäure auf Histidin und Tyrosin untersucht und festgestellt, daß die Diazoverbindung mit diesen Aminosäuren im Verhältnis von 2 : 1 zusammentritt. Hingegen geht aus meinen unten angeführten Untersuchungen mit p-Diazobenzolsulfosäure hervor, daß für diesen Diazokörper das Bindungsverhältnis ein Mol Diazobenzolsulfosäure : ein Mol Histidin der Analysenberechnung zugrunde gelegt werden muß. Gewisse Derivate des Histidins, z. B. Carnosin, verhalten sich aber anders.

Unter den Proteinbausteinen findet sich, wie Pauly schon in seiner ersten Mitteilung hervorgehoben hat, ein Körper, der in ähnlicher Weise wie Histidin mit Diazolösungen reagiert, das Tyrosin. Da die meisten Proteinstoffe neben dem Histidin auch Tyrosin enthalten, so ist in der Mehrzahl der Fälle eine Hydrolyse derselben und die Abtrennung der Histidinfraktion vor Anwendung des Titrierverfahrens erforderlich, und für diesen Zweck können die unten beschriebenen Methoden benutzt werden.

Die Abtrennung einer Histidinfraktion aus dem Gemisch der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Proteins ist auch aus dem Grunde notwendig, weil die Gegenwart von Aminosäuren sowie von anderen im speziellen Teil angeführten Verbindungen die Kuppelung des Histidins und Tyrosins mit Diazokörpern mehr oder weniger behindert. Diese Hinderung tritt

jedoch nicht ein, wenn die Amidosäuren zu größeren Gruppen peptidartig vereinigt sind, somit ist es auch möglich, die Titration im unzersetzten Molekül derjenigen Proteine auszuführen, welche kein Tyrosin enthalten.

Die titrimetrische Bestimmung des Histidins ergibt bei reinem Histidin gut übereinstimmende Werte, auch Histidinmethylester, Imidazol, Tyrosin, Adenin, Guanin und Theophyllin lassen sich in befriedigender Weise mit Hilfe der Titanmethode bestimmen. Bei der Anwendung auf die nach A. Kossel und Kutscher gewonnene «Histidinfraktion» der hydrolysierten Proteine erhält man im allgemeinen höhere Zahlen wie bei der gravimetrischen Analyse. Wenn man die Titrierung an dem unzersetzten Molekül eines tyrosinhaltigen Proteinstoffes ausführt, so sollte man eine Zahl erwarten, welche der Summe von Histidin und Tyrosin entspricht. Dies ist jedoch nicht der Fall, vielmehr ist die gefundene Zahl aus unbekannter Ursache bedeutend niedriger.

Experimenteller Teil.

B. Erstes Verfahren (Silbermethode).

Für die quantitative Bestimmung einzelner Eiweißbausteine kann die Titration mit Silberlösung dienen. Hierzu wird eine $n/10$ - oder $n/100$ -Silberlösung verwandt; mit dieser Lösung können die in Betracht kommenden Körper entweder direkt ähnlich der Mohrschen Silbertitration oder analog der Volhardschen Methode durch Versetzen mit überschüssiger Silberlösung und Ermittlung des Silberüberschusses mit Rhodan bestimmt werden.

Im ersteren Falle wird die freie Base, deren Salz oder Ester in wenig Wasser gelöst und hierauf so lange mit Silbernitrat versetzt, bis eine herausgenommene Probe der Titrierflüssigkeit mit alkalischer Diazobenzolsulfosäure keine Färbung mehr zeigt. Die Konzentration der Silberlösung richtet sich nach der Menge der zu titrierenden Substanz. Wegen der öfteren Entnahme der Probenflüssigkeit zur Feststellung des Endpunktes kann die erste Titration nur als Orientierung dienen und es müssen zur genaueren Bestimmung mehrere Kontroll-

analysen gemacht werden. Die Titration von Histidin kann in neutraler, schwach saurer oder schwach ammoniakalischer Lösung ausgeführt werden. Bei Anwendung des Volhardschen Prinzips wird die Base aus wässriger, schwach salpetersaurer Lösung mit einer bestimmten Menge überschüssiger Silbernitratlösung ausgefällt und das überschüssige Silber mit Rhodanlösung unter Zusatz von Eisenindikator zurücktitriert. Der abfiltrierte Silberniederschlag kann durch eine auf gravimetrischem Wege ausgeführte Silberanalyse zur Kontrollbestimmung dienen. Diese Methode läßt sich natürlich nur da verwenden, wo es sich um Basen handelt, welche unlösliche Silberverbindungen eingehen.

Tabelle I.

	Untersuchte Substanz			Verbrauchte Menge der Silbernitratlösg.	Angenommenes Verhältnis Base Silber	Gefundene Substanz
	Proz.-Gehalt der Lösung	Anzahl der Kubikzentimeter	An-gewandte Substanzmenge			
Histidin	0,2	20	0,0400	5,25	1 : 2	0,0392
Histidindichlorhydr.	0,2	20	0,0400	6,60	1 : 2	0,0403
Histidinmethylesterdichlorhydrat . .	1,2028	10	0,12028	24,95	1 : 3	0,1203
Imidazol	0,8772	10	0,0877	12,9	1 : 1	0,0877
Guanin ¹⁾	1,4168	10	0,1417	9,32	1 : 1	0,141
Theophyllin ¹⁾ . . .	1,5559	10	0,156	7,98	1 : 1	0,154

Die Verbindungen der Monoamidosäuren mit Silber werden durch Wasser weitgehend zersetzt, daher ist eine quantitative Bestimmung dieser Körper auf diese Weise nicht möglich; andererseits verhindert aber auch die Anwesenheit von Aminosäuren die Titration der obengenannten analysierten Basen, da ja die Monoamidosäuren einen Teil des Silbers in Beschlag nehmen.

Beispiel: Eine Lösung von 0,2214 g Glykokoll und 0,1048 g Histidin verbrauchen 22,60 $n/10$ -Silberlösung. Das Histidin

¹⁾ Nach dem Prinzip von Volhard titriert.

hätte 13,9 ccm $n/10$ -Silberlösung erfordert, die überschüssig verbrauchte Silberlösung entspricht dem zugesetzten Glykokoll, woraus sich eine Menge von 0,1043 g berechnet, 0,1171 g Glykokoll blieben untitriert. Auf gleiche Weise versuchte ich Arginin, Lysin, Alanin, Clupein und Asparagin bei Gegenwart von Glykokoll zu titrieren, auch in diesen Fällen konnten aus gleichem Grunde keine genauen Werte erhalten werden.

Die Bestimmung des Histidingehaltes im unzerlegten Sturin erwies sich nach dieser Methode nicht möglich, da die übrigen Aminosäuregruppen des Sturinmoleküls ebenfalls Silberumsetzten, wodurch ein erheblich höherer Histidinwert entstand, als auf gravimetrischem Wege und durch Titantitration erhalten wurde.

C. Zweites Verfahren (Titration mit p-Diazobenzolsulfosäure).

Die Bestimmung dieser Imidazol- und Proteinderivate läßt sich auch auf direktem Wege in der Kälte mit Normaldiazolösung ausführen. Als Lösung dient hierzu eine $n/10$ -Diazobenzolsulfosäurelösung, welche durch Mischung gleicher Volumina $n/5$ -Sulfanilsäurelösung und $n/5$ -Natriumnitritlösung bereitet wird; diese Lösungen können getrennt aufbewahrt werden und sind kurz vor der Titration in der Kälte zu mischen.

Die $n/10$ -Diazolösung läßt man aus einer Eisbürette allmählich unter Umrühren in die auf 0° C. gekühlte sodaalkalische Lösung der zu titrierenden Substanz eintropfen. Von Zeit zu Zeit wird ein Tropfen der Titrierflüssigkeit auf einem Tüpfelteller mit einer alkalischen Lösung von technischem K-Salz (1 : 8 : 4 : 6 amidonaphtholdisulfosaures Natrium)¹⁾ oder H-Salz (1 : 8 : 3 : 6 amidonaphtholdisulfosaures Natrium) zusammengebracht. Ist alles Histidin in Diazofarbstoff übergeführt, so befindet sich in der Titrierflüssigkeit freie Diazolösung, welche schon in geringer Menge mit den obengenannten Indikatoren eine tief violette Farbe gibt. Wegen der öfteren Entnahme von Probenflüssigkeit zur Feststellung des Endpunktes

¹⁾ Diese, sowie zahlreiche andere Farbstoffkomponenten wurden mir von der Badischen Anilin-Sodafabrik und von den Farbwerken Bayer & Co., Elberfeld bereitwilligst zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle den genannten Fabriken bestens danken möchte.

kann die erste Titration nur zur Orientierung dienen und müssen zur genaueren Bestimmung mehrere Kontrollanalysen ausgeführt werden. Auf diese Weise wurden Bestimmungen am Histidin, Imidazol und Sturin ausgeführt. Die folgende Zusammenstellung zeigt, daß sich annähernde Werte erreichen lassen.

Tabelle II.
Titration mit p-Diazobenzolsulfosäure.

Angewandte Substanz	Menge	Verbrauchte Menge der n/10-Diazo- lösung in ccm	Gefunden g
Histidin	0,1	7	0,1085
Histidinmethylesterdichlorhydrat	0,1	5	0,1025
Imidazol	0,1	15	0,102
Sturinsulfat	0,1	0,85	0,013 Histid.

D. Drittes Verfahren (Titanmethode).

Bei der Prüfung des Titanverfahrens beschränkte ich mich auf die Verwendung von p-Diazobenzolsulfosäure und Diazobenzolarsinsäure, welche beide schon von Pauly in ihrem Verhalten zu Histidin und Tyrosin untersucht worden sind.

Ich führte die Titrierung in folgender Weise aus: Eine geringere Menge der zu titrierenden Substanz wurde in Wasser gelöst, sodann mit 20 ccm 96^o/oigem Alkohol versetzt und eine frisch bereitete sodaalkalische¹⁾ Lösung von Diazobenzolsulfosäure oder Diazobenzolarsinsäure im Überschuß zugegeben. Die entstandene Farbstofflösung wurde hierauf auf dem Wasserbade solange erwärmt, bis der Alkohol vollständig verflüchtigt war. Die alkalische Lösung wurde sodann mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit einer Reduktionslösung von bekanntem Titer bis zur vollständigen Entfärbung titriert. Da die Bestimmung der Diazogruppe durch Natriumhydrosulfit und Zinnchlorür in den meisten Fällen nur fehlerhafte Resultate

¹⁾ Die p-Diazobenzolsulfosäure wurde nach Pauly (Diese Zeitschr., Bd. 42, S. 508 Anm.), die Diazobenzolarsinsäure aus käuflichem Atoxyl (Pauly, Diese Zeitschr. B. 94, S. 284) dargestellt.

ergab, beschränke ich mich im folgenden auf die Beschreibung der Titrationsmethode durch Titan, wie sie von Knecht und Hibbert¹⁾ für ähnliche Zwecke ausgearbeitet wurde. Hiernach wird die saure Lösung des Farbstoffes im Überschuß mit einer Titantrichloridlösung von bestimmtem Gehalt versetzt und nach kurzem Erwärmen und darauffolgendem Abkühlen der Überschuß des Titanosalzes durch eine Zehntel-Normaleisenoxydsalzlösung unter Anwendung von Rhodansalz als Indikator ermittelt. Wegen der leichten Oxydierbarkeit der Titanlösung durch den Luft-sauerstoff wurde die Titration nach der Vorschrift von Knecht und Hibbert in indifferenter Gasatmosphäre ausgeführt.

Aus dem verbrauchten Volumen der Titanlösung kann der Diazostickstoff und aus dieser Zahl weiter der Farbstoff bzw. die Menge der Imidazolkomponenten berechnet werden. Bei der Reduktion sollten nach Angabe von Knecht und Hibbert (l. c.) auf ein Molekül des Farbstoffs bzw. eine Azogruppe 4 Moleküle Titantrichlorid kommen. Bei meinen zahlreichen Versuchen zeigte sich jedoch, daß ein Mol des aus Tyrosin und aus Imidazolderivaten entstandenen Farbstoffs nur ein Mol Titantrichlorid zur Reduktion erfordert. Die Reduktion des Farbstoffs verläuft hier also in anderem Sinne. Die Reduktionslösung wurde etwa $n/10$ -normal dargestellt und mit Eisenoxydalaun ($n/10$ -Lösung) eingestellt.

Da Diazobenzolsulfosäure für sich in alkalischer Lösung sehr rasch unter Bildung von Farbstoffen umgewandelt wird, so wurde, um genaue Werte zu erhalten, stets neben dem Hauptversuch ein Blindversuch mit der Diazobenzolsulfosäure ausgeführt, dessen Ergebnis bei der Berechnung in Abzug gebracht wurde.

I. Blindversuch: 10 ccm einer 2%igen Diazobenzolsulfosäurelösung alkalisch mit Alkohol verkocht, dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit 20 ccm $n/10$ -Titanlösung versetzt, verbrauchen zum Zurücktitrieren des überschüssigen Titans 19,5 ccm $n/10$ -Eisenlösung.

0,5 ccm Titanlösung werden daher von 10 ccm Diazolösung verbraucht.

Hauptversuch: 10 ccm einer 1%igen Histidinlösung versetzt mit 10 ccm 2%igen Diazobenzolsulfosäurelösung und 20 ccm $n/10$ -Titan-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 36/II, S. 1552.

lösung. Es sind 13,0 ccm einer $n/10$ -Eisenlösung zum Zurücktitrieren des überschüssigen Titans erforderlich. Für das Histidin wurden demnach $7,0 - 0,5 = 6,5$ ccm $n/10$ -Titantrichloridlösung verbraucht entspr. $6,5 \times 0,0155 = 0,1007$ g Histidin = 1,007% Histidin.

II. 10 ccm einer 1%igen Tyrosinlösung versetzt mit 10 ccm 2%iger Diazolösung und 20 ccm $n/10$ -Titanlösung verbrauchen: 14,0 ccm $n/10$ -Eisenlösung entspr. 0,0996 g Tyrosin = 0,996% Tyrosin.

III. 10 ccm einer 1%igen Imidazolösung versetzt mit 10 ccm 2%iger Diazolösung und 20 ccm $n/10$ -Titanlösung verbrauchen 4,8 ccm $n/10$ -Eisenlösung entspr. 0,0999 g Imidazol = 1,00% Imidazol.

IV. 10 ccm einer 1%igen Histidinmethylesterchlorhydratlösung versetzt mit 10 ccm 2%iger Diazolösung und 20 ccm $n/10$ -Titanlösung verbrauchen 14,5 ccm $n/10$ -Eisenlösung entspr. 0,1025 g Histidinester = 1,02% Histidinmethylesterchlorhydrat.

V. 10 ccm einer 1%igen Adeninnitratlösung versetzt mit 10 ccm 2%iger Diazolösung und 20 ccm $n/10$ -Titanlösung verbrauchen 14,5 ccm $n/10$ -Eisenlösung entspr. 0,1035 g Adeninnitrat = 1,03% Adenin.

VI. 10 ccm einer 1%iger Guaninchlorhydratlösung versetzt mit 10 ccm 2%iger Diazolösung und 20 ccm $n/10$ -Titanlösung verbrauchen 14,2 ccm $n/10$ -Eisenlösung entspr. 0,0991 g Guaninchlorhydrat = 0,99% Guanin.

Tabelle III.

Titration mit Titantrichlorid.

Untersuchte Substanz	Angewandte Menge	Gefundene Menge
Histidin	0,1000	0,1007
Tyrosin	0,1000	0,0996
Imidazol	0,1000	0,1000
Histidinchlorhydrat	0,1000	0,1004
Histidinmethylesterdichlorhydrat	0,1000	0,1025
Adeninnitrat	0,1000	0,1035
Guaninchlorhydrat	0,1000	0,0991

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde in einem tyrosin-freien und histidinhaltenen Proteinstoff, dem Sturin, die Histidmenge bestimmt. Es ergab sich im nicht hydrolysierten Sturinsulfat 13,1% Histidin.

Eine andere Bestimmung wurde in dem durch Kochen mit 33%iger Schwefelsäure hydrolysierten Sturin ausgeführt. Hier wurde 12,6% Histidin gefunden. Die Behinderung durch die

bei der Hydrolyse frei werdenden Aminosäuren ist also gering. Ähnliche Zahlen wurden auch bei Anwendung des unten angeführten Verfahrens (völlige Ausschaltung der Monoaminosäuren) gefunden, s. u. F.

Bei den tyrosinhaltigen Proteinen ist die Bestimmung nicht direkt ausführbar, da das Tyrosin sich an der Farbstoffbildung beteiligt. Hier muß daher der Proteinstoff zunächst hydrolysiert und in dem Hydrolysenprodukt das Histidin von der Hauptmenge der Amidosäuren und besonders von Tyrosin abgetrennt werden.

E. Hinderung durch beigemischte Substanzen.

Die Reaktion zwischen Diazokomponenten und den untersuchten Eiweißbausteinen wird durch eine große Anzahl von Körpern verhindert. So wirkt z. B. die Gegenwart geringer Mengen Harnsäure auf die Entstehung von Histidin- oder Tyrosinfarbstoff hindernd ein. Setzt man zu normalem Harn ein Histidinsalz zu, so tritt mit Diazolösung keine Rotfärbung auf und die Base kann titrimetrisch nicht bestimmt werden. Wird die Harnsäure jedoch nach der Farbstoffbildung zugesetzt, so tritt keine Veränderung des gebildeten Farbstoffes ein.

Auch beim Imidazol und den Purinkörpern, welche unter gewöhnlichen Bedingungen mit Diazokörpern reagieren, wird die Farbstoffbildung durch Harnsäure verhindert. Ähnlich wie diese Säure wirken auch eine große Anzahl anderer Körper ein. Um die Atomgruppe festzustellen, welche die Farbstoffbildung stört, wurden organische Verbindungen von verschiedener Zusammensetzung und Konstitution zu Versuchen herangezogen. Diese Körper wurden in molekularen Mengen der Lösung von Imidazol, Histidin, Tyrosin und Theophyllin zugesetzt. Alle Monoaminosäuren zeigten hierbei denselben hindernden Einfluß auf die Diazoreaktion, allerdings nicht in gleichem Maße. Molekulare Mengen von Glykokoll verhindern die Reaktion fast vollständig, während die entsprechenden Mengen Alanin und Lysin einen geringeren Einfluß auf den Reaktionsverlauf haben. Ähnlich verhalten sich auch zwei-basische Aminosäuren wie z. B. Asparaginsäure. Von den

isomeren Amidovaleriansäuren verursacht die α -Amidovaleriansäure eine erhebliche Reaktionsverzögerung, während die δ -Amido-n-Valeriansäure kaum einen Einfluß auf die Reaktion hat. Taurin wirkt stark hindernd. Ebenso wie durch Glykokoll wird auch durch Hydroxylamin- und Hydrazinsalze die Diazoreaktion stark beeinträchtigt; substituierte Hydrazine, wie Phenylhydrazin, Methylphenylhydrazin oder Diphenylhydrazin, zeigen das gleiche Verhalten. Amidoguanidin wirkt ebenfalls stark hindernd auf den Reaktionsverlauf ein, während das an Amidogruppen ärmere Guanidin einen bedeutend geringeren Einfluß zeigt. Daß jedoch die Anhäufung von Amidogruppen oder Imidogruppen nicht allein die hindernde Eigenschaft besitzt, kann daraus geschlossen werden, daß Harnstoff und viele seiner Derivate, ferner carbaminsaures Ammonium oder Hexamethylentetramin die Diazoreaktion nicht hindern. Endlich wurde noch das Verhalten der mit der Harnsäure in nahem Zusammenhange stehenden Barbitursäure geprüft. Diese Säure zeigt keine Reaktionsverhinderung; ebensowenig Körper mit der $—C—N=N—C$ -Bindung wie z. B. Benzalazin. Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß keine bestimmten Gruppen die Diazoreaktion verhindern, sondern daß vielmehr bestimmte Körperklassen in Betracht kommen, wie z. B. die Aminosäuren. Wenn man die Aminogruppe dieser Säuren durch Benzoylieren oder durch Behandlung mit einem andern Säurechlorid verstopft und diese neuen Körper den Imidazol- oder Purinderivaten zusetzt, so tritt die Farbstoffbildung mit Diazokörpern ein und die Reaktion ist eine quantitative, auch wenn man größere Mengen als molekulare der Lösung zugesetzt hat. Andererseits wird durch Veresterung der Carboxylgruppe die Wirkung der Aminosäuren nicht beeinflusst; Glykokolläthylester z. B. wirkt wie freies Glykokoll stark hindernd auf die Diazoreaktion ein; Glycinamid dagegen schwächer.

Ferner konnte durch zahlreiche Versuche festgestellt werden, daß die hindernde Wirkung der Aminosäuren dadurch abgeschwächt wird, daß man die Säuren durch Kondensation aneinander kettet. So wirkt z. B. das Triglycid erheblich schwächer auf die Diazoreaktion ein wie freies Glykokoll.

Dasselbe gilt auch von Leucylglycin. Der Einfluß wird um so schwächer, je mehr Aminosäurereste zu einem Komplex vereint sind; Clupein hat keinen Einfluß mehr auf die Diazoreaktion.

Andererseits konnte ich nachweisen, daß der Zusatz eines Reaktionsgemisches, welches durch weitgehende Hydrolyse von Protein gewonnen ist und somit reichlich freie Amidosäuren enthält, die Diazoreaktion stark beeinträchtigt; so konnte z. B. durch das Hydrolysat des Clupeins eine starke Verhinderung der Diazoreaktion nachgewiesen werden.

Ein gleiches Verhalten zeigen auch Histidin und Tyrosin, solange sie im Proteinmolekül verfestigt sind. Sind diese Basen nicht frei, sondern an größere Komplexe gebunden, so wird ihre Diazoreaktion durch keinen der oben genannten Körper verhindert. Schon Histidinmethylester vereinigt sich in Gegenwart von Harnsäure oder Aminosäuren mit Diazokörpern zu Farbstoffen; während jedoch diese Reaktion noch teilweise durch oben genannte Körper verhindert werden kann, so beeinflußt die Gegenwart von freien Amidosäuren die Bestimmung des Tyrosins und Histidins im unzersetzten Proteinmolekül nicht (siehe unter Versuch 38 und 39). In den hydrolysierten Eiweißkörpern wurde dagegen stets weniger Histidin gefunden, da die abgebauten Aminosäuren ihren störenden Einfluß auf das freie Histidin- oder Tyrosinmolekül zur Geltung brachten (s. Versuch 40).

Die Ursache dieser Behinderung konnte bisher nicht festgestellt werden. Die Untersuchung des Gefrierpunktes einer Lösung, welche äquimolekulare Mengen von Histidin und Glykokoll oder Histidin und Hydrazin enthielt, ergab keine Anhaltspunkte für die Annahme einer Vereinigung beider. Ebenso wenig konnte ich durch die Untersuchung des optischen Drehungsvermögens oder durch chemische Reaktionen oder durch Kristallisationsversuche eine Erscheinung feststellen, welche für eine solche Erklärung spricht.

Die folgende Zusammenstellung einiger Versuche zeigt, in welchem Maße die Titration des Histidins nach der Titanmethode mit Diazobenzolsulfosäure durch die zugefügten Substanzen beeinflußt wird.

Wässrige Lösung von	verbraucht ccm n/10 Titan- lösung.	entspr. Pro- zenten des angewandten Histidins.
1) 5 ccm 1% Histidin ohne Zusatz	3,25	100,7
2) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Glykokoll	0	0
3) 5 ccm 1% Histidin + 0,59 Alanin	1,3	40,3
4) 5 ccm 1% Histidin + 1% Lysin	0,9	27,9
5) 5 ccm 1% Histidin + 0,45 Asparagin	2,0	62
6) 5 ccm 1% Histidin + 0,9 Asparagin	0,4	12
7) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Guanidin	2,9	90
8) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Amidoguanidin	0,3	9
9) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Harnstoff	3,25	100
10) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Diphenyl- harnstoff	3,25	100
11) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Thioharnstoff	3,25	100
12) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Carbaminsäure	3,0	91
13) 5 ccm 1% Histidin + 0,1 Harnsäure	0,2	6
14) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Barbitursäure	3,25	100
15) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Hydrazinsulfat	0	0
16) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Hydroxylamin	0	0
17) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Hexamethylen- tetramin	3,25	100
18) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Benzalazin	3,25	100
19) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Taurin	1,0	30
20) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 salzs. Phenyl- hydrazin	0,8	25
21) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 salzs. Di- phenylhydrazin	0,4	12
22) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 salzs. Methyl- phenylhydrazin	0,3	9
23) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 α -Amido- valeriansäure	1,5	46
24) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 δ -Amido-n- valeriansäure	3,1	96
25) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Hippursäure	3,25	100
26) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Benzolsulfo- glykokoll	2,9	90

Wässrige Lösung von	verbraucht ccm n/10 Titan- lösung.	entspr. Pro- zenten des angewandten Histidins.
27) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Benzolsulfo- alanin	3,0	91
28) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Benzolsulfo- asparagin	3,0	91
29) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Naphthalin- sulfoglykokoll	3,1	93
30) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Glycinamid	2,0	62
31) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Glykokoll- äthylester	0	0
32) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Triglycid	2,4	74
33) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 Leucylglycin	2,4	74
34) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 unzersetztes Clupeinsulfat	3,25	100
35) 5 ccm 1% Histidin + 0,5 hydrolysiertes Clupeinsulfat	1,3	40
36) 0,1 g Histidinmethylesterchlorhydrat ohne Zusatz	5,0	100 (Histidinmethy- l-esterchlorhydrat)
37) 0,1 g Histidinmethylesterchlorhydrat + 0,5 Glykokoll	1,0	20 (Histidinmethy- l-esterchlorhydrat)
38) 1 g Edestin ohne Zusatz	1,8	2,7 Histidin
39) 1 g Edestin + 0,5 Glykokoll	1,8	2,7 Histidin
40) 1 g hydrolysiertes Edestin + 0,5 Glykokoll	1,0	1,5

F. Isolierung der Histidinfraktion aus hydrolysierten Proteinen.

Die titrimetrische Bestimmung des Histidins in den Proteinen setzt die Hydrolyse und die Herstellung einer Histidinfraktion voraus, um das Histidin der Reaktionsbehinderung durch die übrigen Amidosäuren zu entziehen und um das Tyrosin auszuschalten. Für diesen Zweck habe ich die beiden folgenden Methoden benutzt.

I. Hydrolyse mit Jodwasserstoff und Phosphor und Trennung nach der Silbermethode.

Die Hydrolyse der Eiweißkörper mit Jodwasserstoff und rotem Phosphor wurde nach dem Verfahren von A. Kossel und F. Kutscher¹⁾ ausgeführt. Hiernach wurden 2,3 Teile Jod, 0,28 Teile roter Phosphor mit 1,7 Teilen destilliertem Wasser angesetzt, anfangs gekühlt und später erhitzt, bis die Flüssigkeit farblos war, dann durch Glaswolle filtriert. In diese Lösung wurde ein Teil des zu untersuchenden Eiweißkörpers eingetragen und zuerst eine Stunde auf dem Wasserbad und später 12 Stunden im Paraffinbad am Rückflußkühler erhitzt. Die klare, fast wasserhelle Flüssigkeit wurde sodann zur Entfernung des Jodwasserstoffs, der Phosphor- und phosphorigen Säure mit Bleiacetat versetzt und das überschüssige Blei wieder mit Schwefelwasserstoff ausgefällt; durch Einleiten von Kohlensäure wurde der Schwefelwasserstoff entfernt. Zur Trennung des Histidins von Tyrosin wurde die Lösung solange mit einer konzentrierten wässerigen Silberlactatlösung versetzt, bis eine Tüpfelprobe mit Barytwasser eine Braunfärbung ergab. Nun fügte ich zu der ganzen Reaktionsflüssigkeit vorsichtig Barytwasser, bis die vom Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit eine Rotfärbung mit Phenolphthalein zeigte. Der Niederschlag, welcher das Histidin quantitativ als Histidinsilber, enthielt, wurde abfiltriert und genügend ausgewaschen; das Tyrosin bleibt im Filtrat. Der Histidinsilberniederschlag wurde hierauf mit verdünnter Salzsäure zerlegt; die vom Chlorsilber abfiltrierte Histidinchloridlösung konnte sodann nach der oben beschriebenen Methode mit Titanlösung titriert werden.

II. Trennung nach der Quecksilberchloridmethode.

Dieses Verfahren ist einfacher als das vorhergehende. Die zu untersuchende Substanz wird mit der 10fachen Menge konzentrierter Salzsäure oder 33%iger Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler im Ölbad hydrolysiert.²⁾ Dem Hydrolysat

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 31, S. 179 u. f.

²⁾ Anfangs wurde bei diesen Versuchen eine geringe Menge Zinnchlorür zugesetzt, um die sich bildenden Huminsubstanzen zu beseitigen.

wird dann so viel konzentrierte Sublimatlösung zugefügt, daß auf ein Molekül der zu erwartenden Histidinmenge reichlich 2 Moleküle Sublimat entfallen. Nun wird die Lösung durch Natriumcarbonat alkalisch gemacht, filtriert und ausgewaschen. Der Niederschlag wird in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit; nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs wird das Histidin nach der Titanmethode titriert.

Durch eine Reihe von Versuchen überzeugte ich mich davon, daß Histidin, welches in der eben beschriebenen Weise mit Jodwasserstoff, Schwefelsäure oder Salzsäure behandelt und sodann der Fällung mit Silberlactat oder mit Quecksilberchlorid unterworfen ist, bei der Titantitration genau wiedergefunden wird. Ebenso wird das Histidin in einer Mischung mit Arginin mit hinreichender Genauigkeit bestimmt, wie folgender Versuch zeigt.

Je 0,3 g Histidin wurde mit 0,6 g Arginin gemischt in 100 ccm Wasser gelöst. Eine derartige Mischung wurde während 12 Stunden der Wirkung siedender Jodwasserstoffsäure unterworfen und nach der Silbermethode gefällt, eine zweite gleiche Menge 12 Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht und mit Quecksilberchlorid gefällt. In beiden Fällen fand ich bei der Titantitrierung 0,31 g Histidin.

G. Ergebnisse der Untersuchung von Proteinen.

Als ich nun nach diesen Methoden eine Reihe von Proteinen der Hydrolyse und der Histidinbestimmung unterwarf, zeigte sich, daß in einzelnen Fällen (z. B. beim Hämoglobin) Zahlen gefunden wurden, welche mit den in der Literatur angeführten vollkommen übereinstimmen, in anderen Fällen ergaben sich jedoch Abweichungen, für die ich bisher keine Erklärung gefunden habe. Ich führe einige Analysenzahlen an, welche nach der Hydrolyse der Proteine durch Jodwasserstoff bei der Titantitration der Histidinfraktion gewonnen sind.

Es zeigte sich jedoch, daß letztere beim Fällen mit Quecksilberchlorid und darauffolgendem Zerlegen mit Schwefelwasserstoff im Niederschlag zurückbleiben und die Titration nicht hindernd beeinflussen.

Die Titration wurde in den hier angeführten Fällen vergleichsweise mit p-Diazobenzolsulfosäure und mit diazotiertem Atoxyl ausgeführt. In allen Fällen sind die Analysen berechnet worden unter der Annahme, daß ein Mol Histidin einem Mol $TiCl_3$ entspricht.

Tabelle IV.

	Histidin in Gewichtsprozenten des hydrolysierten Proteins		
	Ermittelt durch Titantitration des Histidinfarbstoffs mit		Frühere Analysen
	p-Diazobenzolsulfosäure	diazotiertem Atoxyl	
Protein a. Kaninchenmuskeln	5,8	5,2	—
Leim	0,55	0,6	0,4 (Hart) ¹⁾
Edestin ²⁾	4,3—4,5	4,8	—
Edestin a. Hanfsamen	2,7	2,5	2,10—2,36 (A. Kossel u. Patten) ³⁾
Histon aus Thymus .	2,0	2,2	1,2—1,5 (A. Kossel u. F. Kutscher, ⁴⁾ Abderhalden u. Rona) ⁵⁾
Histon aus Dorschtestikeln	2,3	2,1	2,34 (A. Kossel u. F. Kutscher) ⁶⁾
Casein	3,4-3,7-3,8	3,6	2,59 (Hart) ⁷⁾
Hämoglobin	10,07	10,6	10,96 (Abderhalden) ⁸⁾

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. A. Kossel für die Anregung zu obigen Versuchen und für seine gütigen Ratschläge an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 33, S. 347.

²⁾ Präparat der Höchster Farbwerke.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 38, S. 39.

⁴⁾ Diese Zeitschr., Bd. 31, S. 184.

⁵⁾ Diese Zeitschr., Bd. 41, S. 278.

⁶⁾ Diese Zeitschr., Bd. 31, S. 165.

⁷⁾ Diese Zeitschr., Bd. 33, S. 347.

⁸⁾ Diese Zeitschr., Bd. 37, S. 484.