

Über das Verhalten des Histidins gegen Pikrolonsäure.

Von

P. Brigl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Januar 1910.)

Die Pikrolonsäure, von Steudel¹⁾ in die physiologische Chemie eingeführt, hat sich als Fällungsmittel einer ganzen Reihe von Basen bewährt. Am meisten benutzt wurde sie und leistete die wichtigsten Dienste bei der quantitativen Bestimmung der bei der Spaltung der Eiweißkörper gewonnenen Aminosäuren Arginin und Histidin. Hierfür sind von A. Kossel und Pringle,²⁾ sowie Weiß³⁾ genaue Vorschriften angegeben, nach denen die Mengen von Arginin und Histidin aus den Salzen $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ (Argininpikrolonat) und $C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ (Histidinpikrolonat)

berechnet werden. Diese gewichtsanalytische Methode gibt nach Weiß «verglichen mit den bei der Kjeldahlbestimmung gefundenen Werten, beim Arginin sehr gute, beim Histidin zufriedenstellende Resultate».

Gelegentlich einer neuen Beschreibung der bisher dargestellten Salze des Histidins geben nun Abderhalden und Einbeck⁴⁾ an, daß das Histidinchlorhydrat resp. -Dichlorhydrat sich stets mit zwei Molekülen Pikrolonsäure zu einem Dipikrolonat verbindet. Hiernach erschien die Existenz eines Monopikrolonates recht zweifelhaft.

Demgegenüber stellte ich nun noch einmal fest, daß man aus freiem Histidin, wenn man sich an die Vorschriften von A. Kossel und Weiß hält, das Monopikrolonat erhält.

Das zu den folgenden Versuchen nötige Histidin wurde folgendermaßen gewonnen:

5 l defibriertes Rinderblut wurden mit dem gleichen Volumen 0,9% iger Kochsalzlösung versetzt und in der Kossel-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219, und Bd. XLIV, S. 157.

²⁾ Ibid., Bd. XLIX, S. 318.

³⁾ Ibid., Bd. LII, S. 112.

⁴⁾ Ibid., Bd. LXII, S. 331.

schen Zentrifuge ausgeschleudert; der Blutkörperkuchen wurde auf dem Wasserbad unter Zusatz von 300 g Seesand getrocknet und zu einem lockeren Pulver verrieben. Zur Hydrolyse wurde auf je 1000 g getrockneter Blutkörperchen 1 l konzentrierter Salzsäure verwandt, mit der 10 Stunden gekocht wurde. Dann wurde, nach Zusatz von Tierkohle, durch Einleiten von Wasserdampf der größere Teil der Säure vertrieben, mit 30%iger Kalilauge bis zur nur noch schwach sauren Reaktion versetzt und filtriert. Jetzt wurde mit Natriumcarbonat deutlich alkalisch gemacht und das Ammoniak durch Wasserdampf vertrieben, was durch die Dampfdestillation sich recht rasch erreichen läßt. Es ist vorteilhaft, das Ammoniak möglichst vollständig zu vertreiben, da sonst der Verbrauch an Quecksilberchlorid und später an Phosphorwolframsäure unnötig groß wird. Beim Erkalten und noch mehr beim Eindampfen der zur Vorsicht wieder schwach angesäuerten Lösung schieden sich große Salzmenngen ab. Von diesen kann abfiltriert werden, sie enthalten kaum Histidin, und man entfernt so, neben viel anorganischer Substanz, einen größeren Teil anderer, störender Amidosäuren. Das Filtrat wurde in dauernd alkalischer Lösung mit Quecksilberchlorid gefällt und der Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die von Schwefelquecksilber und Schwefelwasserstoff befreite Lösung wurde mit Schwefelsäure auf etwa 4% gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Mit dem Zusatz des Reagens wird aufgehört, wenn in einer Probe die Fällung nicht mehr momentan, sondern erst nach einigen Sekunden auftritt. Da für das Folgende eine sorgfältige Entfernung von Salzsäure aus dem Niederschlag notwendig ist, wird dieser noch einmal in 4%ige Schwefelsäure eingetragen, sorgfältig damit verrieben und abgesaugt. Dann wird er mit Baryt zersetzt, filtriert, aus dem Filtrat das Baryum durch Kohlensäure vertrieben und die eingeeengte Lösung mit Salpetersäure angesäuert. Es wird nun eine gerade ausreichende Menge Silbernitrat zugefügt. Zu erkennen ist ein Überschuß daran, daß eine Probe der Lösung mit Baryt keine rein weiße mehr, sondern eine gelbliche Fällung ergibt. Nachdem von dem in saurer Lösung Fallenden abfiltriert, wird mit Baryt

neutralisiert, der Histidinsilberniederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat stark eingedampft. Das hierbei sich in einer Menge von 18 g abscheidende Histidin ist schon recht rein.

Wir haben vorgezogen, nach der Quecksilberfällung noch mit Phosphorwolframsäure und dann mit Silbernitrat und Baryt zu fällen, weil das Histidin dann entschieden reiner ist, als wenn man die Quecksilberfällung direkt verarbeitet, und dadurch der geringe Mehraufwand an Mühe reichlich aufgewogen wird.

Das so gewonnene freie Histidin ließ sich nun leicht mit Pikrolonsäure zu einem Monopikrolonat kondensieren:

1 g Histidin in wenig Wasser wurde mit 1,7 g Pikrolonsäure versetzt, die in Alkohol in der Hitze gelöst waren. Die Mengenverhältnisse entsprechen molekularen Mengen. Es fallen gelbe Flocken aus, deren Menge nach 16 stündigem Stehen 2,58 statt 2,7 g betrug. Wäre der ausfallende Körper das Dipikrolonat, so könnte seine Menge höchstens 2,2 g betragen, indem nur eine Hälfte des Histidins in Reaktion tritt. Außerdem müßte dann aus der Mutterlauge durch Zusatz von Pikrolonsäure wiederum Pikrolonat ausfällbar sein, was nicht der Fall war. Der Körper ließ sich aus Wasser umkrystallisieren, wovon in der Hitze 80 Teile, in der Kälte etwa 500 zur Lösung ausreichten. Das Pikrolonat bestand aus rein gelben, mikroskopisch kleinen Nadeln, deren Zersetzungspunkt bei raschem Erhitzen bei 232° lag.

Eine Stickstoffbestimmung ergab folgende Werte:

0,1399 g Substanz liefern 29,4 ccm Stickstoff bei 17° und 751 mm.

$C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_5N_4O_5$ berechnet: 23,43% N.

Gefunden: 23,94% N.

Für das Dipikrolonat berechnet sich 22,5% N.¹⁾

Zum weiteren Beweis, daß das Monopikrolonat vorlag, wurde es mit Salzsäure zersetzt und in einem Extraktionsapparat die Pikrolonsäure durch Äther extrahiert.

¹⁾ Steudel hat bei seinen Analysen 24,02 und 23,10% N gefunden und die Zahlen auf das Monopikrolonat bezogen. (Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 157.) Da die eine Verbindung mit 24,02% N aus Histidindichlorid hergestellt war, so hat hier offenbar Histidindipikrolonat vorgelegen; freilich paßt der Stickstoffwert besser auf das Monopikrolonat.

1.35 g Pikrolonat ergeben so:

0.720 g Histidinchlorhydrat, 0.854 g Pikrolonsäure.

$C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ berechnet: 0.735 g Histidindichlorhydrat,
0.850 g Pikrolonsäure.

$C_6H_9N_3O_2 \cdot 2C_{10}H_8N_4O_5$ berechnet: 0.45 g Histidindichlorhydrat,
1.04 g Pikrolonsäure.

Zweifellos erhält man also das Histidinmonopikrolonat, wenn man sich an die Vorschriften von A. Kossel und Weiß hält. Geht man allerdings, wie Abderhalden und Einbeck, von Histidinmono- oder Dichlorhydrat aus, so kommt man zum Dipikrolonat, wie folgender Versuch zeigt:

1 g Histidin in 64,5 ccm $n/10$ -Salzsäure, der für ein Mol. berechneten Menge, gelöst, ergaben nur 3,44 g Dipikrolonat, statt der theoretischen 4,4 g, also 78%. Es wurde so verfahren, daß zunächst nur ein Mol. (1,7 g) Pikrolonsäure hinzugefügt wurde und zum Filtrat dann erst ein weiteres Mol., wodurch hier die Fällung erst vollständig wurde. Auch der zuerst auskrystallisierende Teil bestand aus Dipikrolonat, wie durch die Zerlegung mit Salzsäure bewiesen werden konnte.

1.25 g ergaben 0,44 g Histidindichlorhydrat, 0,95 g Pikrolonsäure.

Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2C_{10}H_8N_4O_5$: 0.41 g Histidindichlorhydrat,
0,96 g Pikrolonsäure.

0.1585 g Substanz ergaben 30,3 ccm N bei 15° und 772 mm.

Gefunden: 22,7% N.

$C_6H_9N_3O_2 \cdot 2C_{10}H_8N_4O_5$ berechnet: 22,5% N.

Daß die Ausbeute so schlecht ist, beruht offenbar darauf, daß die aus dem Chlorhydrat freiwerdende Salzsäure auf einen Teil des Pikrolonates wieder zersetzend einwirkt. Deshalb ist dies Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins nicht geeignet, sondern dafür geht man von freiem Histidin aus und wägt als Monopikrolonat.

Verwendet man auf ein Mol. Histidin 2 Mol. Pikrolonsäure, so kann man auch aus der freien Amidosäure das Dipikrolonat erhalten.

0,5 g Histidin mit 1,7 g Pikrolonsäure ergab so 1,96 g Dipikrolonat statt 2,2 g, d. h. 89%.

Die beiden Pikrolonate unterscheiden sich durch ihre Farbe. Die Monoverbindung ist rein gelb, die Diverbindung orange.