

der eben ausreichenden Menge 3 n-Natronlauge (Überschuss vermeiden!!), Filtrieren der Lösung durch ein Faltenfilter in einen 1000 *ccm* Messkolben — sorgfältiges Auswaschen des Filters!! — und Auffüllen bis zur Marke gewonnen. 1 Minute nach Mischen der Histidinlösung mit dem Reagens wird angefangen abzulesen. Es wird auf 20 *mm* eingestellt. Das Maximum der Farbe tritt nach 6 Minuten auf und ist 2—3 Minuten haltbar. Zur Berechnung multipliziert man die *mm*-Vergleichslösung mit 0,000 002. Die Zahl gibt Gramm Histidindichlorid in *x ccm* Lösung an. *x* soll zwischen 0,01 und 1 *ccm* betragen.

Zur Bestimmung des Histamins in Eiweiss und eiweisshaltigem Material verfahren M. J. Hanke und K. K. Koessler¹⁾ nach folgender Vorschrift: Trocknes Material wird direkt der Hydrolyse unterworfen, wasserhaltiges zunächst durch Zusatz von Alkohol auf einen Gehalt von 75% desselben gebracht, nach Zusatz einiger Tropfen Essigsäure 1—2 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wird filtriert, worauf sowohl Filtrat A als Rückstand B durch Erhitzen auf dem Wasserbade vom Alkohol befreit werden. Die Hydrolyse wird mit 20%iger Salzsäure durch 30 Stunden langes Kochen unter Rückfluss vorgenommen. Die Salzsäure wird durch Destillation im Vakuum bei 60°, das Ammoniak durch Behandeln mit Calciumhydroxyd und Alkohol und Vakuumdestillation bei 40°, das Humin durch Filtration entfernt. Die mit Salzsäure angesäuerte Lösung wird zur Trockene verdampft, wiederum in verdünnter Salzsäure gelöst und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird in viel Wasser mit Bariumhydroxyd in der Hitze zerlegt, das überschüssige Bariumhydroxyd aus dem Filtrat mit Schwefelsäure entfernt, diese zur Trockene verdampft und der Rückstand in möglichst wenig Wasser gelöst. Das Histamin wird durch Extraktion mit Amylalkohol gewonnen. Durch Schwefelsäure wird das Histamin dem Amylalkohol wieder entzogen. Dieser Vorgang wird nach genauem Neutralisieren mit Bariumhydroxyd und Eindampfen des Filtrates noch zweimal wiederholt, um noch ev. in Spuren vorhandenes Histidin zu entfernen. Schliesslich wird das Histamin durch Silbernitrat und Bariumhydroxyd gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure und Schwefelsäure zerlegt und in dem genau neutralisierten Filtrat das Histamin wie oben das Histidin colorimetrisch bestimmt. 1 *mm* des Colorimeters entspricht 0,0 01 333 *mg* Histamin.

Diese Bestimmungsmethoden des Histamins, bezw. auch des Histidins haben eine grössere analytische Bedeutung, da Bestimmungen der proteinogenen Aminé, zu denen das Histamin gehört, und die wertvolle Arzneimittel darstellen, sehr wichtig werden dürften.

¹⁾ Journ. of. Biol. Chem. 43. 543/556 (1920).

Mit Rücksicht hierauf sei eine Arbeit von C. L. Lautenschläger¹⁾ angeführt, die die titrimetrische Bestimmung des Histidins und anderer Imidazolderivate behandelt. Lautenschläger arbeitete 3 Verfahren aus, die sich auch auf andere Imidazolderivate anwenden lassen. Das Silberverfahren 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 gibt. 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. 1 Mol. Imidazol entspricht einem Atom Silber, 1 Mol. freies Histidin 2 Atomen Silber, 1 Atom Histidinmethylester 3 Atomen Silber. Bei Gegenwart von anderen Aminosäuren — Glykokoll, Alanin, Arginin — ist die Methode nicht anwendbar. Dagegen können auch andere mit Diazolösung sich kuppelnde Imidazolverbindungen wie Guanin, Theophyllin, Adenin ziemlich genau titriert werden.

Die Titration mit Diazolösungen beruht auf der Fähigkeit der Imidazolverbindungen sich mit Diazoverbindungen unter Bildung von Azofarbstoffen zu kuppeln. Man fügt eine Lösung von p-Diazobenzolsulfosäure zu der zu bestimmenden Lösung der Imidazolverbindung und ermittelt durch Tüpfelproben den Moment, wo sich überschüssige Diazolösung vorfindet. Die Tüpfelproben werden mit technischem K-Salz (1:8:4:6 = amidonaphtoldisulfosaures Na) oder H-Salz (1:8:3:6 = amidonaphtoldisulfosaures Na) ausgeführt, welche mit p-Diazobenzolsulfosäure einen bedeutend dunkleren (tiefvioioletten) Farbstoff liefern als die Imidazolverbindungen. Die zur Titration verwendete $\frac{1}{10}$ p-Diazobenzolsulfosäurelösung wird dadurch hergestellt, dass man kurz vor der Titration eine $\frac{1}{5}$ Sulfanilsäurelösung und eine $\frac{1}{5}$ Natriumnitritlösung mischt. Die $\frac{1}{10}$ Diazolösung lässt man aus einer Eisbürette allmählich unter Umrühren in die auf 0° gekühlte sodaalkalische Lösung der zu titrierenden Substanz eintropfen.

Als 3. Methode gibt Lautenschläger das sogenannte Titanverfahren an. Man fügt zu der Lösung, in der man das Histidin bestimmen will, die Diazolösung im Überschuss hinzu, so dass das Histidin völlig unter Farbstoffbildung 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, die der Farbstoff in der Siedehitze auf eine Lösung von Titantrichlorid von bekanntem Gehalt ausübt (E. Knecht und E. Hibbert²⁾). Diese

¹⁾ Ztschrft. f. physiol. Chemie 102, 226 (191⁸). — ²⁾ Ber. Deutsch. Chem. Ges. 36, 1552 (1903), vergl. diese Ztschrft 43, 627 (1904).

wird hierbei zu Titantrichlorid oxydiert; aus der titrimetrisch ermittelten Menge des oxydierten Titans ergibt sich die Menge des Farbstoffes, somit auch bei Kenntnis des Bindungsverhältnisses die Menge der Farbstoffkomponenten — in diesem Falle des Histidins, Imidazols usw. Das Verhältnis, in welchem p-Diazobenzolsulfosäure und Imidazolverbindungen, Histidin, Guanin, Theophyllin — sowie auch das gleichfalls kuppelnde Tyrosin zusammentreten, wurde zu 1 : 1 ermittelt. Bei der Ausführung der Titration wird eine geringe Menge der zu titrierenden Substanz in Wasser gelöst, sodann mit 20 cm 96%igem Alkohol versetzt und eine frisch bereitete Lösung von Diazobenzolsulfosäure oder Diazobenzolarsensäure im Überschuss zugegeben. Die entstandene Farbstofflösung wurde hierauf im Wasserbade so lange erwärmt, bis der Alkohol vollständig verflüchtigt war. Die alkalische Lösung wurde sodann mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit einer Titantrichloridlösung von bekanntem Titer bis zur vollständigen Entfärbung titriert. Nach kurzem Erwärmen und darauf folgendem Abkühlen wird die überschüssige TiCl_3 -Lösung mit einer $\frac{1}{10}$ Ferrisalzlösung zurücktitriert. Wegen der leichten Oxydierbarkeit des TiCl_3 wird die Titration in einem indifferenten Gasstrom ausgeführt. Es ergab sich, dass 1 Mol. des aus Tyrosin und Imidazolderivaten entstandenen Farbstoffes nur 1 Mol. TiCl_3 zur Reduktion erfordert. Die TiCl_3 -Lösung wurde etwa $\frac{1}{10}$ dargestellt. 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 wird. In tyrosin-freien Proteinen lässt sich die Bestimmung der Imidazolgruppen nach diesem Verfahren direkt ausführen. Bei den tyrosinhaltigen Proteinen ist die Bestimmung nicht direkt ausführbar, da das Tyrosin sich an der Farbstoffbildung beteiligt. Hier muss daher das Protein zunächst hydrolysiert und in dem Hydrolysenprodukt das Histidin von der Hauptmenge der Aminosäuren und besonders vom Tyrosin abgetrennt werden. Die Reaktion zwischen Diazokomponenten und den untersuchten Eiweissbausteinen wird durch Harnsäure, Monoaminosäuren und zweibasischen Aminosäuren verhindert. Ebenso wirken auch noch eine Reihe anderer Stoffe hemmend ein. Im unzersetzten Proteinmolekül wird die Reaktion des Imidazol- und des Tyrosinkomplexes durch die Anwesenheit von Aminosäuren nicht beeinflusst. Um das Histidin der Reaktionsbehinderung durch die Monoaminosäuren zu entziehen, ist daher eine Abtrennung der Histidinfraction angezeigt. Diese erfolgt entweder nach dem Silber-Baritverfahren oder nach dem Sublimatverfahren. Im ersten Falle wurde das Protein mit Jodwasserstoff und Phosphor hydrolysiert. 2,3 Teile Jod, 0,28 Teile roter Phosphor werden mit 1,7 Teilen Wasser angesetzt, anfangs gekühlt, später erhitzt, bis die Flüssigkeit farblos ist, dann

durch Glaswolle filtriert. Das zu untersuchende Protein wird in dieser Lösung hydrolysiert, das klare, fast wasserhelle Hydrolysat zur Entfernung von Jodwasserstoff, Phosphor und phosphoriger Säure mit Bleiacetat versetzt und das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff wieder ausgefällt und der Schwefelwasserstoff vertrieben. Zur Trennung des Histidins von Tyrosin wird die Lösung so lange mit einer konzentrierten wässrigen Silberlactatlösung versetzt, bis eine Tüpfelprobe mit Baritwasser eine Braunfärbung ergibt. Nach Zugabe von Barit bis zur phenolphthaleinalkalischen Reaktion wird der Niederschlag abfiltriert; er ist tyrosinfrei.

Bei dem Sublimatverfahren erfolgt die Hydrolyse des Proteins mit konzentrierter Salzsäure oder 33%iger Schwefelsäure. Dem Hydrolysat wird dann so viel konzentrierte Sublimatlösung zugefügt, dass auf 1 Mol. der zu erwartenden Histidinmenge reichlich 2 Mol. Sublimat entfallen. Die mit Soda alkalisch gemachte Lösung wird filtriert und der Niederschlag ausgewaschen. Nach der Zersetzung derselben mit Schwefelwasserstoff kann das Histidin mit der Titanmethode bestimmt werden.

Die Gegenüberstellung dieser Lautenschlägerschen Untersuchungen mit ihren Ergebnissen und der Hanke-Kösslerschen Methode lässt erkennen, wo die Schwächen der Hanke-Kösslerschen Methode zu suchen sind. Immerhin sind beide Arbeiten wichtig genug, um eingehend referiert zu werden. Auf dem begonnenen Weg wird sich ein brauchbares Bestimmungsverfahren für Histidin und seine Derivate ermitteln lassen. Die Hanke-Kösslersche Methode erscheint dem Berichtersteller aus dem Grunde auch verbesserungsbedürftig, als dem wichtigsten Grundsatz jeder Colorimetrie nicht Rechnung getragen sein dürfte: Man muss bei einer exakten Colorimetrie als Vergleichsfarbe eine solche Farbe benutzen, die bezügl. der optischen Eigenschaften das gleiche Absorptionsspektrum wie die zu bestimmende Farblösung hat. Diesem Grundsatz ist hier nur bedingt Rechnung getragen. Man wird wohl zu einigermaßen genauen Werten kommen, absolut genau dürften sie aber nie werden. Es dürfte sich empfehlen, Lösungen der entsprechenden Azofarbstoffe (analog der Pauly'schen Histidin—bis—azobenzolarsensäure) als Vergleichsfarben zu benutzen.

Paul Hirsch.

Gegen das Verfahren zur Bestimmung des Tyrosins in Eiweisskörpern von O. Folin und W. Denis¹⁾ haben sich E. Abderhalden und D. Fuchs²⁾ gewandt. Die Verfasser konnten feststellen, dass die colorimetrische Methode von Folin und Denis die Bestimmung des Tyrosins durch Kristallisation nicht zu ersetzen vermögen, da bei ihr auch andere Aminosäuren (Tryptophan und Oxytryptophan) mit

¹⁾ Vergl. diese Ztschrft. 53, 659 (1914). — ²⁾ Ztschrft. f. physiol. Chem. 83, 468/473 (1913).