

Die Streuungen der Analysenwerte sind für einen Fehler von ± 2 s bei der Zeitmessung berechnet. Diese Genauigkeit ist leicht einzuhalten; damit der Meßfehler klein bleibt gegenüber dem Meßergebnis, ist für höhere O_2 -Konzentrationen die Dauer der Farbentwicklung zu verlängern, für niedere zu verkürzen; dies geschieht durch Erhöhung bzw. Senkung des Farbstoffzusatzes im Absorptionsrohr. Meßfehler von ± 5 s zeigen einen apparativen oder methodischen Fehler an. Der quantitative Nachweis von rd. 0,2% O_2 dauert insgesamt ~ 10 min, dabei werden ~ 5 l Gas verbraucht; zum Nachweis, daß ein Gasstrom weniger als 0,05% O_2 enthält, sind 10 l notwendig, für die Doppelbestimmung also 20 l. Störend sind Gase mit saurer Reaktion, wie CO_2 , H_2S , SO_2 , u. zw. schon in Konzentrationen von $\sim 1\%$ ab, weil sie die Alkalität der Reaktionslösung ändern und der Farbumschlag an einen verhältnismäßig schmalen p_H -Bereich gebunden ist (s. o.). Außerdem stören ungesättigte Kohlenwasserstoffe von $\sim 10\%$ ab, weil auch sie durch alkalische $Na_2S_2O_4$ -Lösung langsam oxidiert werden.

Reagentien.

Die Lösung von Natriumhydrosulfit ist nur sehr begrenzt haltbar und deshalb jeden Tag frisch anzusetzen. Zur Bestimmung kleiner O_2 -Konzentrationen ist die 10%ige Lösung vorteilhaft noch weiter zu verdünnen.

Zur Bereitung der Indigocarmin-Lösung werden 4–5 g „Indigocarmin optimum, teigförmig, Merck“ in 1 l Wasser durch kurzes Aufkochen möglichst vollständig gelöst, die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt und filtriert. Zum Zeichnen der Sättigung soll auf der Nutsche ein kleiner Rückstand Indigocarmin hinterbleiben.

Die Vergleichsfarben werden folgendermaßen hergestellt: Für den Eichten Orange werden 50 Tropfen einer kalt gesättigten

Lösung von Naphtholorange in 200 cm³ Wasser eingetropft. Die Lösung ist lichtbeständig und ändert ihre Nuance auch in mehreren Monaten nicht merklich. Für den Eichten Blau werden 3 cm³ der kalt gesättigten Indigocarmin-Lösung, die auch im Absorptionsrohr verwandt wird, mit 200 cm³ Wasser verdünnt. Die Lösung bleicht im Hellen wie im Dunklen langsam aus. Für die Vergleichslösung ist dies aber ohne Bedeutung, denn man wählt als Schlußpunkt der Messung nicht die Farbgleichheit in Absorptionsgefäß und Vergleichslösung, sondern den Augenblick, in dem die Rotkomponente im Farbton der Meßlösung eben verschwindet und der Farbton in ein reines Blau übergeht. Es kommt also weniger auf die immer gleichbleibende Stärke der blauen Vergleichslösung an, sondern darauf, daß sie den charakteristischen Rotstich zeigt.

Dagegen darf diese Unbeständigkeit nicht vernachlässigt werden bei der Indigocarmin-Lösung, die zur Füllung des Absorptionsrohres dient. Dieser Variablen wird auf folgende Weise Rechnung getragen: Die Bestimmung wird mit einem Gas bekannten O_2 -Gehaltes n% durchgeführt. Der Eichkurve ist die Zeitdauer t s für den Farbumschlag zu entnehmen. In mehreren Versuchen wird die Menge x cm³ der Farbstofflösung bestimmt, die der Reaktionslösung im Absorptionsrohr zugesetzt werden muß, damit der Sauerstoff-Konzentration n% die Zeit t s entspricht.

Zur Eichung dienen Gase aus Stahlflaschen, u. zw. N_2 , H_2 , CO , CH_4 , die geringe Mengen O_2 enthielten, außerdem Mischungen dieser Gase mit vollkommen O_2 -freiem Stickstoff, der in einer von Meyer u. Ronge⁴⁾ beschriebenen Anordnung hergestellt wurde. Zur Mischung der Gase dienen genau durchgeeichte Strömungsmesser. Sehr elegant ist der Vorschlag von Hofer u. v. Wartenberg⁵⁾, den Sauerstoff-Zusatz elektrolytisch zu erzeugen und durch Regelung der Stromstärke zu dosieren.

Eingeg. 6. Oktober 1942. [A. 58.]

⁴⁾ Diese Ztschr. 52, 637 [1939].

Colorimetrische Bestimmung der Alpha-Aminosäuren Arginin und Tyrosin im Eiweiß*)

Von Privatdozent Dr. E. RAUTERBERG

Landw. Versuchsstation des Deutschen Kalisyndikates, Berlin-Lichterfelde-Süd

Die α -Aminosäuren, aus denen das Eiweiß aufgebaut ist, bestimmen nach Art und Menge den Wert der Eiweißstoffe als Nahrungs- und Futtermittel. Zur Bestimmung der Aminosäuren müssen die Eiweißstoffe hydrolysiert werden; dies geschieht mit Fermenten, Säuren oder auch Laugen. Da die Präparate zur fermentativen Hydrolyse häufig Aminosäuren enthalten, die gesondert bestimmt werden müssen, und da ihre Wirksamkeit durch Begleitsubstanzen der Eiweißstoffe beeinflusst werden kann, sind die Ergebnisse etwas unsicher. Andererseits wird bei der Hydrolyse mit Säuren oder Laugen, die besser reproduzierbare Ergebnisse liefert, nicht die gleiche Menge an Aminosäuren gefunden wie bei der fermentativen Hydrolyse, so daß nur bedingt Schlüsse über die Verwertbarkeit der Eiweißstoffe durch den Tierkörper zu ziehen sind. Außerdem werden beim Kochen mit den relativ starken Säuren und Laugen organische Verbindungen zerstört und in dunkelbraun oder auch schwarz gefärbte Substanzen übergeführt, die das Hydrolysat intensiv färben und entfernt werden müssen, wenn die Aminosäuren colorimetrisch bestimmt werden sollen. Häufig sind in den Hydrolysaten auch Verbindungen enthalten, welche ebenfalls eine Farbreaktion geben wie die zu bestimmende Aminosäure und daher ebenfalls vor der Analyse zu entfernen sind. Die Entfernung derartiger Verbindungen ist i. allg. schwieriger als die Entfernung der gefärbten Substanzen. Einzelne Verbindungen lassen sich wohl durch Ausfällung beseitigen, andere können durch Ausschütteln mit Äther, Chloroform usw. entfernt werden, wobei die p_H -Zahl des Hydrolysats eine große Rolle spielt. Ob Säuren oder Laugen zur Hydrolyse zu verwenden sind, richtet sich nach der Empfindlichkeit der Aminosäuren. Schließlich ist die Haltbarkeit der gefärbten Lösung zu prüfen.

Alle diese Schwierigkeiten sind zu beachten und möglichst zu umgehen, wenn eine brauchbare Bestimmungsmethode ausgearbeitet werden soll. Die Arginin-Bestimmung, die im folgenden geschildert wird, ist ein lehrreiches Beispiel hierfür und wie es gerade bei colorimetrischen Bestimmungen darauf ankommt, daß alle wohlüberlegten und ausprobierten Vorschriften genau eingehalten werden.

Arginin-Bestimmung.

Die colorimetrischen Methoden zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren haben sich häufig aus Farbreaktionen entwickelt, die zum qualitativen Nachweis der Eiweißstoffe benutzt werden.

1925 war von Sakaguchi¹⁾ entdeckt worden, daß Eiweißstoffe mit α -Naphthol und Natriumhypochlorit eine Rotfärbung liefern, und daß die Rotfärbung auf das Arginin zurückzuführen ist. Poller²⁾ untersuchte, welche Verbindungen außer Arginin eine derartige Rotfärbung geben, und fand eine positive Reaktion bei Dicyandiamid, Monomethylguanidin usw., negative Reaktion z. B. bei Guanidin, asym. Dimethylguanidin, Nitroguanidin usw. Für das Auftreten der Farb-reaktion ist der Guanidin-Kern verantwortlich, u. zw. muß mindestens ein Wasserstoff-Atom substituiert sein; außerdem dürfen von einer Amino-Gruppe zwei Wasserstoff-Atome nicht substituiert sein, und schließlich darf keine Amino-Gruppe mit einem negativen Substituenten verbunden sein. Um die Haltbarkeit der Rotfärbung zu verbessern, ersetzte Weber³⁾ das Hypochlorit durch Hypobromit und zerstörte das überschüssige Hypobromit durch Harnstoff; durch Eiskühlung wird dafür gesorgt, daß die Reaktion nicht zu schnell verläuft. Wie bei vielen colorimetrischen Methoden muß auch bei der Arginin-Bestimmung die Intensität der entstandenen Farblösung nach einer genau einzuhaltenden Zeitspanne nach Zugabe der Reagentien gemessen werden.

Die Hydrolyse erfolgt mit Säuren, u. zw., da die 2stündige Behandlung mit 10%iger Schwefelsäure bei 200° im zugeschmolzenen Rohr nach Klein u. Tauböck⁴⁾ bei Serienuntersuchungen zu umständlich ist, nach Alten u. Haupt⁵⁾ durch Kochen mit Schwefelsäure bei normalem Druck. Einfluß von Schwefelsäure-Konzentration, Hydrolysezeit und Einwaage auf die Arginin-Menge, die bei der Hydrolyse in Lösung gebracht wird, wurden überprüft. Danach wächst mit steigender Konzentration der Schwefelsäure die Ausbeute an Arginin; bei einer Versuchsreihe mit Haferstroh fanden wir z. B. bei 5%iger Schwefelsäure 10,5 γ Arginin, bei 10%iger 11,5 γ , bei 15%iger 12 γ , bei 20%iger 12,5 γ , bei 25%iger 13,5 γ und bei 30%iger 13,5 γ Arginin. Die Hydrolysezeit und auch die Einwaage haben praktisch keinen Einfluß. Die Pflanzenproben müssen für die Hydrolyse fein zerkleinert werden, es genügt aber, wenn sie in einer Dr.-Körner-Schlagmühle so weit zerkleinert werden, daß die Probe ein 1-mm-Sieb

^{*)} Vorgetragen auf der Kriegsarbeitsstagung der Arbeitsgruppe für Analyt. Chemie und der FBK der Dechema am 24. Oktober 1942 in Frankfurt a. M.

¹⁾ J. Biochemistry 5, 25 [1925].

²⁾ J. biol. Chemistry 86, 217 [1930].

³⁾ Biochem. Z. 251, 10 [1932].

⁴⁾ Bodenkunde u. Pflanzenernähr. 16, 372 [1939].

⁵⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 1927 [1926].

passiert hat, eine weitere Zerkleinerung in einer Walzen- oder Kugelmühle ist nicht erforderlich.

Bei unseren Untersuchungen hat sich folgender Analysengang als brauchbar erwiesen:

Die geernteten Pflanzen wurden bei 65° im Luftstrom (Ventilator-trockenschrank) möglichst schnell getrocknet, anschließend fein gemahlen und 400 mg der Pflanzenprobe mit 20 cm³ 25%iger Schwefelsäure in einem 100-cm³-Erlenmeyerkolben mit eingeschlif-fenem Steigrohr 40 h gekocht. Das Hydrolysat wird mit Wasser auf ~150 cm³ verdünnt und mit (300 mg) Tierkohle unter häu-figem Umschwenken (30—45 min) erwärmt. Nach dem Filtrieren wird die Tierkohle mit heißem Wasser gut ausgewaschen, die Schwefelsäure mit Natronlauge neutralisiert und die Lösung auf 500 cm³ gebracht. 2—4,8 cm³ dieser Lösung, die 3—30 γ Arginin enthalten darf, werden in einem Reagensglas mit eingeschlif-fenem Stopfen mit Wasser auf 4,8 cm³ gebracht, mit 1,2 cm³ 10%iger NaOH und 1 cm³ α-Naphthol-Lösung versetzt, nach kräftigem Umschütteln 15 min in Eiswasser gekühlt, die durch Vorversuch ermittelte Anzahl Tropfen Brom-Lösung zugesetzt und gut um-geschüttelt. Nach genau 15 s wird möglichst schnell 1 cm³ Harn-stoff-Lösung zugegeben (Injektionsspritze) und nach weiteren 6 min die Intensität der Rotfärbung im *Pulfrich*-Photometer gemessen (Filter S 50). Aus Eichkurven, die aus den Extinktions-koeffizienten reiner Arginin-Lösungen hergestellt sind, wird der Arginin-Gehalt der zu untersuchenden Lösung abgelesen.

Reagentien.

1. Brom-Lösung: 5%ige Natronlauge + 3 cm³ Brom auf 500 cm³.
2. 10%ige Natronlauge.
3. α-Naphthol-Lösung: 100 mg α-Naphthol in 100 cm³ Alkohol. Aus dieser Lösung ist täglich für die Verwendung bei der Analyse eine verdünnte Lösung herzustellen, u. zw. werden 10 cm³ mit Wasser auf 50 cm³ verdünnt.
4. Arginin-Standardlösung mit 14 γ Arginin in 1 cm³, 17,54 g Arginincarboxat werden zu 1 l in Wasser gelöst.
5. 25%ige Schwefelsäure (d = 1,182).
6. 20%ige Natronlauge.
7. Tierkohle.
8. 40%ige Harnstoff-Lösung.

Nach dieser Arbeitsvorschrift wurde der Arginin-Gehalt in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen bestimmt; die gefundenen Arginin-Mengen sind in Tab. 1 angegeben.

Tabelle 1. Arginin-Gehalt in verschiedenen Pflanzen.

	Arginin	Arginin-N	Gesamt-N	Arginin-N in % vom Ges.-N
Erbsen	0,81	0,26	3,61	7,2
Saubohnen	0,96	0,31	4,74	6,5
Weiß. Bohnen	0,65	0,21	4,07	5,2
Gerste	0,34	0,11	1,18	9,3
Weizen	0,41	0,13	2,10	6,2
Hafer	0,39	0,32	2,30	13,9
Haferstroh	0,074	0,024	0,69	3,5
Raygras	0,95	0,30	2,47	12,1
Knaulgras	1,08	0,34	2,94	11,6
Wiesenfuchsschwanz	1,12	0,36	3,85	9,4
Luzerne	0,66	0,21	3,19	6,6

Die Zahlen zeigen, daß der Arginin-Gehalt in den ein-zelnen Pflanzen sehr verschieden ist. Aufgeführt sind ferner der Gehalt an Arginin-Stickstoff, der Gesamt-Stickstoff und wieviel Prozent vom Gesamt-Stickstoff aus Arginin-Stickstoff besteht. Danach geht der Gehalt an Arginin-Stickstoff nicht parallel mit dem Gehalt an Gesamt-Stickstoff; der prozentuale Anteil ist z. B. bei der Gerste 9,3 und bei den weißen Bohnen 5,2. Über den Einfluß der Ernährung der Pflanze auf den Gehalt an Arginin-Stickstoff ist an anderer Stelle berichtet⁶).

Tyrosin-Bestimmung.

Die Tyrosin-Bestimmung mit Quecksilber-Salzen und salpetriger Säure geht bis 1853 zurück; *Hoffmann* benutzte als erster das *Millonsche* Reagens auf Phenole zu seiner Be-stimmung. Die chemische Formel der rotgefärbten Verbindung; die dabei entsteht, ist auch heute noch nicht ganz geklärt. Wesentlich ist die Gegenwart einer para-ständigen Hydroxyl-Gruppe, die das Tyrosin als einzige Aminosäure besitzt. Nach *Lug*⁷) können verschiedene gefärbte Verbindungen entstehen, je nachdem, ob ionisierte Quecksilber-Salze, wie Quecksilber-sulfat, oder nichtionisierte, wie Quecksilberchlorid oder -cyanid, zugesetzt werden; die günstigsten Ergebnisse werden erzielt, wenn ein Gemisch benutzt wird, u. zw. eine Lösung, die Queck-silbersulfat und Quecksilberchlorid enthält. Von den anderen Aminosäuren reagiert das Tryptophan mit den Quecksilber-Salzen unter Bildung eines Niederschlages, der deshalb vor Zusatz der salpetrigen Säure abzutrennen und selbstverständ-lich auszuwaschen ist. Das Tryptophan kann im Rückstand bestimmt werden; da es bei der Hydrolyse zum Teil zerstört wird, ist es sicherer, wenn die Tryptophan-Bestimmung in einer besonderen Probe nach *Roth*⁸) durchgeführt wird. Phe-

nole, Indole und Skatole, mit denen die *Millonsche* Reaktion ebenfalls positiv verläuft, dürfen bei der Tyrosin-Bestimmung nicht vorhanden sein; sie sind durch Extraktion der Lösung mit organischen Lösungsmitteln vor der Behandlung mit Quecksilber-Salzen zu entfernen. Die Phenole werden voll-kommen beseitigt, wenn das Hydrolysat bei p_H 1 mit Äther behandelt wird. Sind außerdem Indole und Skatole vorhanden, muß auch bei p_H 8 mit Toluol extrahiert werden. Die orga-nischen Lösungsmittel sind vor Zugabe der Quecksilber-Salze durch Erwärmen der Lösung wieder auszutreiben.

Auch bei der Tyrosin-Bestimmung wurden die Bedingungen untersucht, die bei der Hydrolyse der Eiweißstoffe ein-gehalten werden müssen⁹). Da Tyrosin, wie *Lugg* nachgewiesen hat, beim Erhitzen in saurer Lösung in Gegenwart von Kohlen-hydraten und anderen Aminosäuren zersetzt wird, kann es nicht in demselben Hydrolysat bestimmt werden, in welchem Arginin bestimmt wird. Beim Kochen mit starker Natronlauge wird es dagegen nicht zerstört.

Bei den methodischen Vorarbeiten hat sich folgender Arbeitsgang als brauchbar erwiesen:

1,5 g der feingemahlenden Pflanzensubstanz werden 18 h in einem 100-cm³-Erlenmeyerkolben mit eingeschlif-fenem Steigrohr mit 20 cm³ 5 n-Natronlauge in der Hitze hydrolysiert (der Schliff wird mit 2 Tropfen flüssigem Paraffin geschmiert, um ein Festsetzen durch die Natronlauge zu verhindern) und zur Vermeidung des Schäumens 0,1 cm³ Oktylalkohol zugegeben. Dann wird der Inhalt in einen 100-cm³-Meßkolben übergespült, mit Schwefelsäure auf p_H 1 gebracht (10 cm³ 14 n-H₂SO₄), mit Wasser aufgefüllt und filtriert. 15 cm³ des Filtrats werden 2mal mit ebensoviel Äther ausgeschüttelt und der Äther 2mal mit je 3 cm³ n₁₀-Schwefelsäure ausgewaschen. Die 15 cm³ Filtrat und die 6 cm³ Wasch-Schwefelsäure werden zusammen durch Erwärmen auf 45° vom Äther befreit und dann in einem Meßkolben mit n₁₀-Schwefelsäure auf 25 cm³ gebracht. 5 cm³ der Lösung werden in einem 25-cm³-Zentrifugenglas mit 0,6 cm³ 14 n-Schwefelsäure und 5 cm³ Quecksilber-Lösung B versetzt. Durch ½-stündiges Erhitzen auf 60—65° kommt es zur Umsetzung des Quecksilbers mit Tyrosin und Tryptophan. Nach 1-stündigem Abkühlen mit Leitungswasser wird die ausgeschiedene Tryptophan-Quecksilber-Verbindung abzentrifugiert und der Rückstand mit 10 cm³ verd. Quecksilber-Lösung ausgewaschen. Zentrifugat und Waschlösung werden mit Lösung C in einem Meßkolben auf 25 cm³ gebracht, 15 cm³ davon mit 0,3 cm³ Natriumnitrit-Lösung versetzt und nach 3 min im Stufenphotometer mit Filter S 50 gemessen. Eine u. U. vorhandene Eigenfärbung der zu messenden Lösung wird dadurch ausgeschaltet, daß in die andere Küvette des Stufen-photometers der Rest der Lösung gegeben wird, aber ohne Zu-gabe von Natriumnitrit. Aus dem gemessenen Extinktions-koeffizienten wird in einer Eichkurve der Tyrosin-Gehalt ab-gelesen. In der zu messenden Lösung können 0,05—2 mg Tyrosin enthalten sein. Für jede Küvette, mit der gemessen wird, ist eine besondere Eichkurve erforderlich.

Lösungen.

- Lösung A: 5 n-NaOH (etwa 20 g NaOH in 100 cm³ H₂O).
- Lösung B: 75 g Quecksilbersulfat, 35 g Quecksilberchlorid, 70 g Natriumsulfat (160 g wasserhaltiges Natriumsulfat) werden mit Wasser in einen 1-l-Kolben gebracht, das Natriumsulfat unter leichtem Erwärmen, 125 g (68,3 cm³) konz. Schwefel-säure werden dazugegeben und unter oftmaligem Schütteln am Wasserbad gelöst. Nach dem Abkühlen wird mit H₂O aufgefüllt.
- Lösung C: Verdünnen von Lösung B mit n-Schwefelsäure im Verhältnis 1:1.
- Lösung D: 14 n-Schwefelsäure (Verdünnung von 400 cm³ konz. Schwefelsäure (d = 1,84) auf 1 l (d = 1,39)).
- Lösung E: n-Natriumnitrit-Lösung: 6,9 g Natriumnitrit in 100 cm³ Wasser.
- Lösung F: Standard-Tyrosin-Lösung: 0,25—1 mg Tyrosin in 1 cm³ gelöst, in n₁₀-Schwefel-säure.

Nach dieser Methode wurde der Tyrosin-Gehalt in ver-schiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen bestimmt; die Ergeb-nisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Zahlen zeigen, daß auch der Tyrosin-Gehalt in den Pflanzen sehr verschieden sein kann. Auch der prozentuale Anteil vom Tyrosin-Stick-stoff am Gesamt-Stickstoff ist sehr unterschiedlich, die Eiweiß-stoffe der untersuchten Pflanzenteile sind also verschieden zusammengesetzt.

Tabelle 2. Tyrosin-Gehalt in verschiedenen Pflanzen.

	Tyrosin	Tyrosin-N	Gesamt-N	Tyrosin-N in % vom Ges.-N
Haferkorn	0,72	0,056	2,30	2,43
Haferstroh	0,41	0,032	0,69	4,64
Erbsen	0,81	0,063	3,61	1,74
Saubohnen	0,96	0,074	4,74	1,56
Weiß. Bohnen	0,77	0,060	4,07	1,47
Gerste	0,34	0,026	1,18	2,20
Weizen	0,69	0,053	2,10	2,52
Luzerne	0,71	0,055	3,19	1,72

Eingeg. 31. Oktober 1942. [A. 48.]

⁶) E. Rautenberg u. H. Benischke, Forschungsdienst Sonderheft 15, 159 [1941].

⁷) Biochemical J. 31, 1422 [1937].

⁸) Diese Ztschr. 52, 149 [1939].

⁹) E. Rautenberg u. H. Benischke, Bodenkunde u. Pflanzenernähr., im Druck.