

2. Es liess sich im zellfreien Organextrakt ein äusserst labiles Atmungssystem nachweisen, das bei Zusatz von Aminosäuren, Brenztraubensäure intensiv oxydiert.

3. Die durch Aktivierung bedingte Atmungsgrösse ist durch Kaliumcyanid in m/1000 Konzentration vollständig hemmbar, während die Leeratmung des Extraktes durch Kaliumcyanid auf ca. die Hälfte reduziert wird.

Basel, im Dezember 1945
Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

31. Zur stufenphotometrischen Bestimmung des Histidins

von K. Schmid.

(22. XII. 45.)

Wie *Edlbacher* gemeinsam mit *Baur*, *Staehelin* und *Zeller*¹⁾ nachgewiesen hat, liefert die von *Hanke* und *Koessler*²⁾ ausgearbeitete Bestimmungsmethode des Histidins, welche auf der Kuppelung mit Diazobenzolsulfosäure nach *Pauly* basiert, zu ungenaue Werte. *Edlbacher* und Mitarbeiter konnten jedoch auf Grund derselben Reaktion durch Anwendung von p-Chloranilin einen in Butylalkohol sehr stabilen Azofarbstoff erhalten und so eine äusserst empfindliche Methode entwickeln. Sie schliesst aber den Nachteil in sich, dass sie für Histidin nicht spezifisch ist. Auch andere Imidazolderivate, Tyrosin und Polyphenole zeigen mit verschiedener Empfindlichkeit dieses Verhalten.

Für die Erforschung des Histidin-Stoffwechsels ist es aber von grosser Bedeutung, dass auf Grund einer spezifischen Reaktion gezeigt werden kann, ob am aliphatischen Rest dieser Aminosäure eine Veränderung eingetreten ist.

In der Bromierung des Histidins, die bekanntlich so durchgeführt wird, dass die Histidinlösung mit Bromwasser bis zur Gelbfärbung versetzt und der gebildete Farbstoff in der Wärme entwickelt wird, fand *F. Knoop* einen spezifischen Nachweis. *R. Kapeller-Adler*³⁾ modifizierte diese Reaktion, indem Brom bis zur Blaufärbung von Kaliumjodidstärkepapier zur Lösung zugefügt und der entstandene Farbstoff in Ammoniak-Ammoniumcarbonat-Gemisch entwickelt und seine Intensität stufenphotometrisch gemessen wurde. Arbeitet man jedoch nicht mit reinen Lösungen von Histidin, sondern

¹⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 158 (1941).

²⁾ J. Biol. Chem. **59**, 803 (1924).

³⁾ Bioch. Z. **264**, 131 (1933).

z. B. mit Harn, so stösst diese Bestimmung auf grosse Schwierigkeiten, so dass diese Modifikation nur zur approximativen Schätzung des Histidinegehaltes herangezogen werden kann. Die Schwierigkeit liegt besonders in der Abschätzung der erforderlichen Brommenge, die so bemessen wird, dass zur vollständigen Bromierung ein Überschuss dieses Reagenzes zur Lösung zugetropft werden muss. Aber schon der geringste Bromüberschuss beeinflusst die Nuance des im alkalischen Medium entstehenden Farbstoffes in entscheidender Weise.

Conrad und *Berg*¹⁾ haben deshalb bei der Bestimmung des Histidins in Eiweißhydrolysaten das überschüssige Brom mit arseniger Säure entfernt. Später versuchte *Racker*²⁾ durch eine weitere Modifikation der durch *Conrad* und *Berg* verbesserten Methode das Histidin im Harn zu bestimmen. Diese Variante liefert aber, wie *Edlbacher* (l. c.) bei deren Nachprüfung fand, keine befriedigenden Resultate.

In eigenen Versuchen wurde nun festgestellt, dass die Bromierung aber dann immer im gleichen Sinn verläuft, wenn die Bromierungs-lösung eine bestimmte Acidität aufweist. Beachtet man diese Bedingung und entfernt man das überschüssige Brom mit arseniger Säure, so ist es möglich, auch im Harn eine exakte Bestimmung durchzuführen.

Die endgültige Methode unterscheidet sich demnach von dem ursprünglichen Verfahren von *R. Kapeller-Adler* in den folgenden drei Punkten:

1. Das überschüssige Brom wird nach *Conrad* und *Berg* durch arsenige Säure entfernt.
2. Der Harn wird vor der Durchführung der Bestimmung sehr stark verdünnt.
3. Die Bromierung muss bei Gegenwart von überschüssiger Säure durchgeführt werden.

Beschreibung der Methode.

Der 24-Stundenharn einer Ratte wird auf 100 cm³ mit Wasser verdünnt. Proben von je 1 cm³ dieses verdünnten Harns werden mit steigenden Mengen einer Histidinlösung versetzt, die in 100 cm³ 100 mg Histidinhydrochlorid und 2 cm³ 2-n. Schwefelsäure enthält. Andererseits bereitet man sich eine Schwefelsäure von 1/25 Normalität und füllt damit die mit Histidin versetzten Harnproben auf je 2 cm³ auf. Nun wird soviel einer Bromeisessiglösung (2,5 cm³ Brom + 250 cm³ Eisessig + 750 cm³ Wasser) zugetropft, dass nach 10 Minuten Stehen immer noch ein geringer Überschuss von Brom an der schwachen Gelbfärbung der Lösung zu erkennen ist. Nach 10 Minuten wird die Reaktionsflüssigkeit mit 2 Tropfen einer mit arseniger Säure gesättigten 10-proz. Ammoniaklösung und 2 cm³ eines Ammoniak-Ammoniumcarbonat-Gemisches (2 Teile konz. Ammoniak + 1 Teil 10-proz. Ammoniumcarbonat) versetzt und 5 Minuten im siedenden Wasserbad

¹⁾ J. Biol. Chem. 117, 350 (1937).

²⁾ Biochem. J. 34, 90 (1940).

exponiert, abgekühlt und weitere 10 Minuten zur Entwicklung der Farbe bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird sie mit dem Ammoniak-Ammoniumcarbonat-Gemisch auf 10 cm³ aufgefüllt und anschliessend wird im Stufenphotometer die Intensität der violetten Lösung unter Vorschalten des Filters S 50 in der 5 mm Küvette gemessen. Als Kompensationsflüssigkeit dient der in gleicher Weise behandelte Harn.

Eichkurve zur Bestimmung des Histidins.

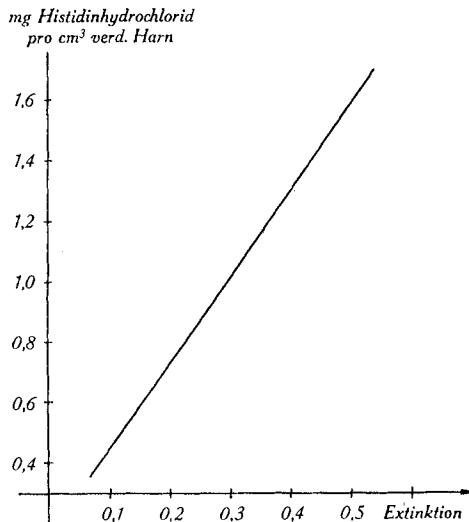


Fig. 1.

Die oben dargestellte Eichkurve ist als Mittel von drei Einzelkurven erhalten worden. Sie zeigt, dass 0,4—1,6 mg Histidinhydrochlorid pro cm³ verdünnten Harnes genau gemessen werden können. Die Einzelbestimmungen schwanken bei gleichem Histidineinhalt bis zu 7 %. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist zehnmal kleiner als diejenige der Methode von *Edlacher* und Mitarbeiter (l. c.), die auf der Kuppelung des Histidins mit diazotiertem p-Chloranilin fußt. Jedoch hat die hier mitgeteilte Methode den Vorteil, dass sie für Histidin spezifisch ist.

Basel, im Dezember 1945.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.