

Die Bestimmung des Amidosäurenstickstoffes im Harn.

Von

Martin Krüger und Julius Schmid.

(Aus der medicinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 13. December 1900.)

Im Band XXX, Seite 75, der Zeitschrift für physiologische Chemie hat M. Pfaundler über ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffes im Harn berichtet. Wir haben im Laufe des letzten Sommersemesters zu demselben Zwecke eine Methode ermittelt, welche im Principe dieselbe sein musste, wie die von Pfaundler, da ja die auszuführenden Operationen durch die bekannten, von anderer Seite festgestellten Eigenschaften der Amidosäuren, das sind die Nichtfällbarkeit durch Phosphorwolframsäure und ihre Beständigkeit gegen Säuren und Alkalien, gegeben waren.

Was die Fällung durch Phosphorwolframsäure betrifft, so haben wir nicht, wie Pfaundler vorschreibt, auf ein bestimmtes Volumen Harn stets die gleiche Menge an Phosphorwolframsäure angewendet. Denn nach den Beobachtungen von Gumlich¹⁾ und Schmied²⁾ löst ein Ueberschuss der Säure einen Theil der zuerst gefällten, stickstoffhaltigen Körper wieder auf. Dieses Lösungsvermögen ist jedoch nur gering, wie folgende Versuche zeigen.

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVII, S. 15.

2) Dubois' Archiv, 1894, S. 552.

Je 10 ccm. Harn wurden nach Zusatz eines Cubikcentimeters 1%iger Salzsäure mit 14, resp. 15, 16 und 20 ccm. Phosphorwolframsäurelösung versetzt. Bei 16 ccm. war nach Gmlich die vollständige Fällung eingetreten. In je 10 ccm. der 4 Filtrate wurde dann der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Für die Gesamtfiltrate berechnet wurden an $\frac{1}{10}$ N.-Säure verbraucht: 45,53, 45,11, 44,44 und 44,73 ccm. Ein Ueberschuss von 4 ccm. der Säure hat demnach eine Menge an stickstoffhaltigen Körpern gelöst, welche 0,29 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure entspricht.

Bei einem zweiten, in gleicher Weise ausgeführten Versuche wurden je 10 ccm. Harn + 1 ccm. Salzsäure mit 4, 5, 6, 7 und 10 ccm. Phosphorwolframsäure versetzt. Bei 6 ccm. war die Fällung vollständig. Verbraucht wurden für die Gesamtfiltrate 11,01, 11,07, 10,76, 10,98 und 11,03 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure. Gelöst ist von 4 ccm. überschüssiger Phosphorwolframsäure an stickstoffhaltigen Substanzen soviel, als 0,27 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure entspricht.

Wenn demnach der durch einen Ueberschuss von Phosphorwolframsäure bedingte Fehler nur klein ist, kann man denselben doch nicht vernachlässigen und die Forderung, für jeden Harn die Menge der Säure festzustellen, nicht umgehen. Allerdings genügt die Austitrirung bis auf 1 ccm.

Die Trennung der Amidosäuren von Harnstoff haben wir ebenfalls durch hydrolytische Spaltung des letzteren in Ammoniak und Kohlensäure bewirkt. Dieselbe erfolgt durch Erhitzen von Harnstofflösungen für sich auf hohe Temperaturen oder bei Gegenwart von Säuren und Alkalien.

Nach den Untersuchungen von M. Krüger¹⁾ und später von C. Wulff²⁾ werden die Purinkörper durch 12—14stündiges Erhitzen auf 180—200° mit concentrirter Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure (2 Volumen Wasser + 1 Volumen concentrirter Schwefelsäure) glatt in Ammoniak resp. in alkylirtes Ammoniak und in 1 Molekül Glycöcoll resp. alkylirtes

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVI, S. 167 u. Bd. XVIII, S. 153.

2) Ibidem.

Glycocoll gespalten. Hieraus ergibt sich, dass die Amidosäuren selbst in solchen Fällen, wo sie sich gleichsam in statu nascenti befinden, beim Erhitzen mit Säuren der genannten Concentration während 14 Stunden und bis zu Temperaturen von 200° völlig beständig sind.

Wir haben daher das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-niederschlag mit dem halben Volumen concentrirter Schwefelsäure versetzt und uns durch Versuchsreihen überzeugt, dass ein 3—4stündiges Erhitzen auf 160—180° im geschlossenen Rohr allen Harnstoffstickstoff in Ammoniak überführt.

M. Pfaundler hat von einer Säurebehandlung im geschlossenen Rohr mit Rücksicht auf die angestrebte klinische Verwendbarkeit der Methode abgesehen. Weshalb ein solches Verfahren nicht klinisch anwendbar sein soll, ist nicht recht verständlich: etwa wegen der nothwendigen Beschaffung eines Schiessofens oder der erforderlichen Fähigkeit des Analytikers, Glasröhren zuzuschmelzen?

Bei der Destillation des Ammoniaks haben wir ebenfalls zunächst versucht, die Hauptmenge der Säure durch fixe Alkalien abzustumpfen und das Ammoniak durch Magnesia usta in Freiheit zu setzen. Wir konnten uns jedoch sofort davon überzeugen, dass nach dem Ueberdestilliren des freien Ammoniaks nachheriger Zusatz von Natronlauge kein weiteres Ammoniak mehr abspaltete, ein Resultat, welches auf Grund der erwähnten Versuche über Spaltung der Purinkörper zu erwarten war, da hier gleichfalls bei Anwendung von Natronlauge die theoretischen Werthe gefunden werden.

Ausführung der Methode.

Man ermittelt zunächst nach Pflüger und Gumlich die zur vollständigen Fällung des Harnes¹⁾ nothwendige Menge an Phosphorwolframsäure, indem man zu je 10 ccm. Harn 1 ccm. 10%ige Salzsäure und dann wechselnde Mengen 10%iger

¹⁾ Concentrirte Harnen, wie Hundeharn, müssen bekanntlich vorher verdünnt werden.

Phosphorwolframsäure gibt. Der Niederschlag setzt sich in allen Fällen leicht ab. Man filtrirt noch 2 Minuten. Das erste Filtrat läuft in der Regel trübe ab, nach mehrmaligem Aufgiessen erhält man jedoch eine klare Flüssigkeit. Zu etwa 1 ccm. derselben gibt man 1 ccm. Phosphorwolframsäurelösung. Tritt nach 2 Minuten keine Trübung mehr ein, so ist die Fällung vollständig. Bestimmt man die Mengen der Phosphorwolframsäure erst bis auf 10 ccm., dann bis auf 5, und schliesslich bis auf 1 ccm. genau, so nimmt die Operation nur kurze Zeit in Anspruch. Bei längere Zeit an einem Individuum fortgesetzten Versuchen hat man ausserdem, wenn der Harn stets auf dasselbe Volumen gebracht wird, an den Säurezahlen der vorhergehenden Tage einen guten Anhaltspunkt.

Ist die Säurezahl gefunden, so gibt man zu einer grösseren Menge, etwa 30 ccm., Harn 3 ccm. 10%ige Salzsäure und die berechnete Menge an Phosphorwolframsäurelösung hinzu und filtrirt nach 2 Minuten durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäss. Gumlisch und Andere lassen die Fällung 24 Stunden in einer ammoniakfreien Atmosphäre stehen. Da wir jedoch bei der Filtration niemals Schwierigkeit gehabt haben, und das Ausfallen eines nochmaligen Niederschlages im Filtrate nicht eintrat, so haben wir von dieser Vorschrift abgesehen.

Nach Herstellung des Filtrates werden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. Es wird in 5 ccm. des ursprünglichen Harnes der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

2. In je 10 ccm. des Filtrates resp. einer solchen Menge, welche 5 ccm. Harn annähernd entspricht, wird:

a) der Gesamtstickstoff, welchen wir Harnstoffstickstoff + Amidosäurenstickstoff nennen wollen, nach Kjeldahl:

b) der Harnstoffstickstoff durch Erhitzen mit dem halben Volumen concentrirter Schwefelsäure während 3—4 Stunden auf 160—180° bestimmt.

Die Differenz zwischen 2a) und 2b) gibt den Amidosäurenstickstoff an.

Bezüglich der Bestimmung 2b ist zu bemerken, dass die Röhren 3—4 Stunden auf 160—180° erhalten werden müssen, die Zeit des Anwärmens also nicht mitgerechnet werden darf. Der Röhreninhalt wird in einen Kjeldahl-Destillirkolben gegossen und die Röhren der Reihe nach mit Wasser, dann mit wenig Natronlauge, um den an den Wandungen haftenden Niederschlag von phosphorwolframsaurem Ammon zu lösen, und schliesslich wiederum mit Wasser nachgespült. Beim Neutralisiren der Schwefelsäure sucht man einen grossen Ueberschuss an Lauge zu vermeiden; für 5 ccm. concentrirte Schwefelsäure genügen 20—22 ccm. 33%iger Natronlauge.

Was die Bedeutung der nach der beschriebenen Methode erhaltenen Werthe für (Harnstoff + Amidosäuren) N, Harnstoff-N und Amidosäuren-N betrifft, so ist zu bemerken, dass im Harn ausser Harnstoff und Amidosäuren noch einige andere stickstoffhaltige Körper vorkommen, welche durch Phosphorwolframsäure nicht oder nicht vollständig gefällt werden. Da jedoch die Angaben hierüber in der Litteratur zum Theil einander widersprechen, so ist eine Nachprüfung des Verhaltens von Phosphorwolframsäure gegen die normal und pathologisch im Harn vorkommenden stickstoffhaltigen Körper wünschenswerth. Jedenfalls ist sicher, dass alle im Phosphorwolframsäurefiltrate vorhandenen stickstoffhaltigen Verbindungen beim Erhitzen mit Schwefelsäure der genannten Concentration auf 160° in Ammoniak und eventuell Amidosäuren zerfallen müssen. Der nach unserer Methode erhaltene Werth für Amidosäurenstickstoff gibt daher thatsächlich nur diesen Stickstoff an, es bleibt aber noch zu entscheiden, ob derselbe in seiner Gesamtheit schon vorgebildet im Harn vorhanden war oder erst bei der Spaltung durch Schwefelsäure aus anderen Körpern entstanden ist.

Wir haben mit der beschriebenen Methode zunächst eine Reihe von normalen und pathologischen Harnen untersucht, vor Allem war zu ermitteln, in wie weit bei Bestimmung des Harnstoffstickstoffes durch Erhitzen mit Schwefelsäure die gefundene Menge abhängig ist von der Temperatur und der Zeit des Erwärmens. Es ergab sich, dass bei Temperatur-

schwankungen von 155—190° und bei Zeitschwankungen von 4—10 Stunden stets dieselben Werthe erhalten wurden. Hier folgen einige Resultate:

Patient	Ges. N	$\overset{+}{(U + A)N}$	$\overset{+}{UN}$	AN	$\overset{+}{UN}$	AN
					in % vom Ges. N	
G.	0.985 g	0.794 g	0.768 g	0.026 g	78%	2.7%
		23.80; 23.95 und 23.83 cem.				
L.	0.562 g	0.499 g	0.485 g	0.014 g	86.3%	2.5%
		17.35 und 17.30 cem.				
Schw.	0.449 g	0.311 g	0.257 g	0.054 g	57.2%	12.0%
		7.67 und 7.65 cem.				

Die Bezeichnungen $\overset{+}{(U + A)N}$ und AN bedeuten (Harnstoff + Amidosäuren-)N und Amidosäurenstickstoff. Die unter den Werthen für Harnstoffstickstoff angegebenen und von einer geschweiften Klammer umfassten Zahlen geben die Anzahlen von Cubikcentimetern $\frac{1}{10}$ N.-Säure an, welche bei Bestimmung des Harnstoffstickstoffes erhalten wurden. Wie ersichtlich, differiren die Zahlen trotz der Schwankungen in der Temperatur und Erhitzungsdauer innerhalb der angegebenen Grenzen nur um höchstens 0,15 cem. $\frac{1}{10}$ N.-Säure.

Die Ausscheidung der Amidosäuren, welche nach den bisherigen Erfahrungen beim normalen Individuum abhängig von der Nahrung ist, wird bei gleicher Nahrung ebenso wie die aller anderen stickstoffhaltigen Verbindungen einen nahezu constanten Werth haben müssen. Eine brauchbare Methode zur Bestimmung der Amidosäuren muss dies zum Ausdruck bringen; ebenso muss sie eine Vermehrung der Amidosäuren in den Fällen nachweisen, wo eine solche mit Sicherheit constatirt ist, wie nach Eingabe bestimmter Medicamente.

Wir haben daher mit unserer Methode zunächst bei einem Hunde, welcher nur mit Fleisch gefüttert wurde, die Ausfuhr an Amidosäurenstickstoff verfolgt und dann bei gleichbleibender Ernährung 3 Tage hintereinander bestimmte Mengen an Glycocoll gegeben, um festzustellen, ob thatsächlich alles Glycocoll, wie angenommen wird, in Harnstoff übergeht.

Versuch am Hunde.

Harnmenge	Ges. N	U	A	N	AN	in % des Ges. N		Bemerkungen
						U	AN	
470 ccm.	14.65 g	13.16 g	12.87 g	0.29 g		87.8%	2.0%	
335	9.59	8.65	8.38	0.27		87.4%	2.8%	
315	10.95	10.05	9.72	0.33		88.7%	3.0%	
542	10.20	9.44	8.92	0.52		87.4%	5.1%	Harn nach 6 g Glycocoll
710	13.00	11.90	11.40	0.50		87.7%	3.8% 12 g ..
325	12.82	11.58	10.94	0.64		85.3%	5.0% 18 g ..
250	7.27	6.75	6.50	0.25		89.4%	3.4%	

Die tägliche Ausscheidung an Amidosäurenstickstoff beträgt bei unserem Hunde nach Fleischfütterung 0,29 g, 0,27 g. und 0,33 g an 3 aufeinander folgenden Tagen. Dieselbe steigt in geringer Weise, doch deutlich an, nach Eingabe von Glycocoll und zwar auf 0,52 g, 0,50 g und 0,64 g. Hiernach scheint ein geringer Theil des Glycocolls unverändert — ob vielleicht gepaart mit einer Säure, muss selbstverständlich dahingestellt bleiben — den Organismus zu passiren; dieser Theil wächst jedoch nicht proportional der Einfuhr an Glycocoll.

Bei einem am Menschen ausgeführten Versuche sollte festgestellt werden, ob der Uebergang von Benzoessäure in Hippursäure durch Zunahme des ausgeführten Amidosäurenstickstoffs mit unserer Methode zum Ausdruck käme. Der Patient, ein 15jähriger Junge im Gewichte von rund 42 Kilo, erhielt täglich an Nahrung: 2 Eier, 100 g Wurst oder Schinken, 60 g Butter, 200 g Milchreis, 320 g Brod und Semmel, 1/2 Liter Bier und 1 Liter Kaffee. Am 7. und 8. Tage nahm er 1.5 g. resp. 2. 1.5 g Natriumbenzoat.

Versuch am Menschen.

Harnmenge	Ges. N	U	A	N	U + A = (U + A)N		Bemerkungen
					U	AN	
1045 ccm.	7.15 g	5.28 g	0.397 g	73.8%	+ 5.5%	= 79.3%	
1185	6.25	4.57	0.339	73.1%	+ 5.4%	= 78.5%	
780	6.69	4.75	0.399	71.0%	+ 6.0%	= 77.0%	
1250	7.45	5.51	0.450	73.9%	+ 6.0%	= 79.9%	
765	7.42	5.44	0.389	73.3%	+ 5.2%	= 78.5%	
925	6.55	4.82	0.325	73.6%	+ 5.0%	= 78.6%	

Harnmenge	Ges. N	UN ⁺	AN	in % des Ges. N			Bemerkungen
				UN ⁺	AN	U + AN	
615 ccm.	7.62 g	5.60 g	0,554 g	73.5° +	7,3°	80.8°	Harn nach 1,5 g Benzolat
615 "	8.58 "	6.05 "	0,888	70.5° +	10,3°	80.8°	" " 3,0 g "
560 "	7.39 "	5.68 "	0.368	76.9° +	5,0°	81,9°	
1075 "	9.02 "	6.97 "	0,290	77,3° +	3,2°	80,5°	

Die absolute Ausscheidung an Amidosäurenstickstoff schwankte in unserem Falle zwischen 0,325 g und 0,45 g N. in Procenten vom Gesamtstickstoff ausgedrückt zwischen 5—6%. Nach Eingabe von 1,5 g, resp. 3 g Natriumbenzoat steigen die absoluten Werthe auf 0,554 g, resp. 0,888 g N. die procentischen auf 7,3%, resp. 10,3%. Unsere Methode zeigt daher in prompter Weise den Uebergang von Benzoesäure in Hippursäure an.

Es mag noch erwähnt werden, dass zur Ermittlung des Harnstoffstickstoffes stets 2 Analysen ausgeführt wurden. Wie weit dieselben übereinstimmen, mögen die folgenden Zahlen, welche die verbrauchten Cubikcentimeter $\frac{1}{10}$ N.-Säure angeben, zeigen:

1. 12.43 und 12.59 ccm.	6. 19.77 und 19.67 ccm.
2. 14.90 " 15.1 "	7. 15.04 " 15.09 "
3. 14.36 " 14.28 "	8. 15.75 " 15.76 "
4. 16.95 " 16.90 "	9. 17.73 " 17.89 "
5. 13.79 " 13.75 "	