

Der Nachweis von Aminosäuren im Harn.

Von

Emil Abderhalden und Lewellys F. Barker, Universität Chicago.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1904.)

Mit Hilfe der β -Naphthalinsulfureaktion gelingt es, wie bereits mehrfach hervorgehoben worden ist,¹⁾ in pathologischen Harnen selbst kleine Mengen von Aminosäuren aufzufinden und zu identifizieren. Diese Methode versagt aber dann, wenn gleichzeitig eine größere Anzahl verschiedener Aminosäuren im Harn vorhanden ist. Es gelingt in diesen Fällen nicht, die Gemische so zu trennen, daß analysenreine Produkte erhalten werden, wohl aber gibt die Methode durch die erhaltenen Annäherungswerte Auskunft über die Art der isolierten Produkte, speziell kann man mit ihr die Frage entscheiden, ob einfache Aminosäuren oder höhere Komplexe vorhanden sind. Für die Isolierung der einzelnen Aminosäuren erwies sich uns die Übertragung der Fischerschen Veresterungsmethode²⁾ von großem Vorteil. Es gelang uns mit Hilfe derselben, aus Harn von mit Phosphor vergifteten Hunden Glykokoll und Leucin direkt nachzuweisen, ferner wurde durch den Nachweis des Phenylacetaldehydgeruches²⁾ Phenylalanin festgestellt. Neben dem Leucin war noch eine süß schmeckende, in absolutem Alkohol unlösliche Aminosäure vorhanden, deren Menge eine Identifizierung leider nicht gestattete.

¹⁾ Emil Abderhalden, Familiäre Cystindiathese, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 557, 1903.

Emil Abderhalden und Peter Bergell, Der Abbau der Peptide im Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 9, 1903.

Emil Abderhalden und Peter Bergell, Über das Auftreten von Monoaminosäuren im Harn von Kaninchen nach Phosphorvergiftung, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 464, 1903.

²⁾ Emil Fischer, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151, 1901.

Experimenteller Teil.

Zwei 6 Wochen alte Hunde erhielten 4 Tage nacheinander je 1 mg Phosphor subkutan als Oleum phosphoratum. Der in dieser Zeit gesammelte Harn wurde filtriert, und nachdem die Abwesenheit von Eiweiß festgestellt worden war, mit β -Naphthalinsulfochlorid in der gewohnten Weise geschüttelt. Es schied sich dabei eine geringe Menge eines Salzes direkt aus. Das Vorhandensein der Millonschen Reaktion des gesammelten Urins macht es wahrscheinlich, daß das Natriumsalz des Dinaphthalinsulfotyrosins vorlag. Das ausgeschiedene Salz wurde abfiltriert, und das Filtrat angesäuert. Hierbei fiel ein ziemlich bedeutender Niederschlag aus, der sich beim Ausschütteln mit Äther zum größten Teil in demselben löste. Beim Abdunsten desselben hinterblieb eine zum Teil kristallinische, zum Teil ölige Masse, welche nach längerem Stehen im Eisschranke völlig erstarrte. Nach mehrmaligem Umfällen aus Normalnatronlauge mit Säure wurde schließlich eine gegen 65° (korr.) schmelzende, kristallinische Verbindung erhalten, deren Analysenzahlen auf β -Naphthalinsulfo-Leucin hinweisen. Zur Analyse wurde im Vacuumexsikkator getrocknet.

0,1001 g Substanz gaben 0,2061 g CO_2 und 0,0601 g H_2O
 Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{NS} + \text{H}_2\text{O}$: 56,63% C und 6,19% H
 Gefunden: 56,15% „ „ 6,67% „

Die in Äther unlösliche β -Naphthalinsulfoverbindung konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden.

250 cem Harn von denselben Versuchstieren wurden, nachdem die Abwesenheit von Eiweiß festgestellt worden war, eingeeengt, wobei sich Tyrosin ausschied, nach dessen Entfernung der Harn vollständig bei 40° unter vermindertem Druck eingedampft wurde. Der Rückstand wurde hierauf mit 150 cem absolutem Alkohol übergossen und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Der Rückstand löste sich hierbei zum größten Teil auf. Von den ausgeschiedenen Salzen wurde abfiltriert, das Filtrat wieder eingeeengt, mehrmals mit 150 cem Alkohol übergossen und wieder Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach mehrmaligem Einengen wurden die Ester in der gewohnten Weise in Äther aufgenommen. Der Estergeruch war sehr deut-

lich erkennbar. Bei der Destillation wurden zwei Fraktionen gemacht. Die bei 100° des Wasserbades bei 14 mm Druck übergegangenen Ester wurden mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols übergossen und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Beim Einimpfen eines Kriställchens von salzsaurem Glykokollester erfolgte auf Eis sofort reichliche Kristallisation. Es konnten 0,2 g salzsaurer Glykokollester isoliert werden. Die Mutterlauge der Kristalle wurde im Vacuum zur Trockene verdampft, und aus dem Rückstand mit Kaliumkarbonat und Natronlauge die Ester in der bekannten Weise in Freiheit gesetzt. Die Menge derselben war sehr gering. Sie wurden zur Verseifung am Rückflußkühler mit ca. der fünffachen Menge Wasser 5 Stunden lang gekocht, und hierauf auf dem Wasserbad eingedampft. Es hinterblieben in Alkohol unlösliche Kristalle. Sie schmeckten süß. Zu einer Identifizierung reichte das Material nicht aus. Die zweite unter 14 mm Druck bei 180° des Ölbades gewonnene Fraktion wurde mit Baryt verseift, der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat eingedampft. Der geringe Rückstand wurde in 2 ccm 25%iger Schwefelsäure gelöst und nach Zusatz einiger Körnchen Kaliumbichromat erwärmt. Es trat sehr deutlich der Geruch nach Phenylacetatdehyd auf.

In einer anderen Portion Harn, welche gleichfalls verestert worden war, wurden nur Spuren von Glykokoll, dagegen größere Mengen von Leucin gewonnen. Das aus Wasser mit Tierkohle umgelöste Produkt gab nach dem Auskochen mit Alkohol folgende Analysenzahlen:

0,1531 g Substanz gaben 0,3082 g CO₂ und 0,1378 g H₂O

Berechnet für C₆H₁₃NO₂: 54,97% C und 9,92% H

Gefunden: 54,9 % C 10,0 % H

Neben dem Leucin war eine in Wasser leicht, in Alkohol unlösliche Aminosäure vorhanden. Auch in dieser Portion ließ sich Phenylalanin nachweisen. Zur Kontrolle wurden 500 ccm Harn von einem normalen Hunde in gleicher Weise untersucht. Es konnten aber keine Spuren von Aminosäureestern isoliert werden.

Diese Erfahrungen zeigen, daß eine Kombination der β -Naphthalinsulfureaktion und der Estermethode gute Resultate gibt. Wir zweifeln nicht daran, daß die Anwendung der Estermethode noch zu weiterer Auffindung von Aminosäuren unter pathologischen Verhältnissen führen wird. Es ist wohl möglich, daß mit ihrer Hilfe noch weitere Abnormitäten im Eiweißstoffwechsel aufgefunden werden können. Es wird vielleicht ganz zweckmäßig sein, den Harn in großer Verdünnung mit Phosphorwolframsäure zu fällen und Niederschlag und Filtrat getrennt zu untersuchen. Erleichtert wird die Isolierung der Ester bei der großen Menge von Salzen ohne Zweifel durch die Lösung der salzsauren Ester in Ätheralkohol¹⁾ und nachherige Befreiung der Ester.

¹⁾ Vergl. Zd. H. Skraup, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure, Diese Zeitschrift. Bd. XLII. S. 277, 1904.