

## Zur Bestimmung der Aminosäuren im Harn.

Von

Dr. **Franz Erben**, klinischem Assistenten.

(Aus der medizinischen Klinik des Obersanitätsrates Prof. R. v. Jaksch in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. November 1904.)

Zu den intermediären Stoffwechselprodukten des menschlichen Organismus gehören auch die Aminosäuren. Die Form, in welcher der normale Mensch dieselben ausscheidet, ist die der Hippursäure, einer gepaarten Aminosäure. Ob normalerweise im Harn neben dieser auch andre Aminosäuren vorkommen, z. B. Leucin und Tyrosin, wie Pouchet<sup>1)</sup> gefunden haben will, steht dahin.

Daß diese aber bei schweren Lebererkrankungen und schweren Infektionen in größerer Menge im Harn ausgeschieden werden, wird übereinstimmend von mehreren Autoren angegeben. Ich<sup>2)</sup> selbst habe mich vor etwa einem Jahre im Anschlusse an die bezüglichen Arbeiten von R. v. Jaksch<sup>3)</sup> mit der Stickstoffverteilung im Harn Infektionskranker beschäftigt und bin zu dem Resultate gekommen, daß es (abgesehen von den Lebererkrankungen) bei Autophagie zu einer vermehrten Ausscheidung von intermediären Stoffwechselprodukten (also auch von Aminosäuren) komme. Schon bei diesen Arbeiten wurde es mir klar, daß zur definitiven Entscheidung dieser Frage eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren im Harn notwendig sei, und ich ging schon vor einem

---

<sup>1)</sup> Pouchet, zit. nach Huppert, Analyse des Harns, 10. Auflage, Wiesbaden 1898, S. 280.

<sup>2)</sup> Erben, Zeitschrift f. Heilkunde, Bd. 25, S. 33, 1904.

<sup>3)</sup> Jaksch, Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. 47, S. 1, 1902 u. Bd. 50, S. 167, 1903.

halben Jahre daran, das von E. Fischer und P. Bergell<sup>1)</sup> ausgearbeitete Verfahren zur Isolierung der Aminosäuren mit Hilfe des  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorids zu einer für die Klinik brauchbaren Methode umzugestalten.

Während ich damit beschäftigt war, ist nun eine dasselbe Thema betreffende Arbeit Ignatowskis<sup>2)</sup> erschienen, die mich veranlaßt, hier in Kürze das von mir geübte Verfahren mitzuteilen.

Ich will auf die Vorversuche nicht eingehen. Dieselben betrafen 1. die Beseitigung störender Substanzen des Harnes, 2. die Frage, ob bei den in Betracht kommenden chemischen Prozeduren nicht aus andern Substanzen des Harnes wie den Purinkörpern und Kreatinin Aminosäuren abgespalten werden, und 3. die Reaktion der Hippursäure und Glykocholsäure mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid.

Im voraus will ich bemerken, daß die gepaarten Aminosäuren die  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen nicht geben, und daß ich in der Voraussetzung, daß vielleicht auch in vielen pathologischen Harnen die Hippursäure die Hauptmenge der Aminosäuren ausmacht, bei meiner Methode auf die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der Hippursäure in derselben Portion Harn Bedacht genommen habe.

Ich gehe so vor:

Ein Liter Harn wird mit einigen Kubikzentimetern halbverdünnter Schwefelsäure angesäuert und mehrmals (mindestens fünfmal) mit Äther, dem  $\frac{1}{10}$  seines Volumens Alkohol zugesetzt ist, ausgeschüttelt. Der alkoholhaltige Äther nimmt neben Oxysäuren und der Hippursäure auch eine große Menge Harnstoff auf, dessen Beseitigung bei den weiteren Reaktionen nur erwünscht ist. Dieser Äther wird nun mit einer geringen Menge mit Soda versetzten Wassers durchgeschüttelt, wobei die Hippursäure dem Äther entzogen und nach dem Ansäuern der wässrigen Flüssigkeit aus derselben mit Essigäther wieder ausgeschüttelt werden kann. Die weitere Reinigung der Hippur-

<sup>1)</sup> E. Fischer u. P. Bergell, Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft, Bd. 35, S. 3779, 1902.

<sup>2)</sup> Ignatowski, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 371, 1904.

säure geschieht auf die gewöhnliche Weise. (Waschen mit Petroläther, Umkristallisieren mit Tierkohle.) Ich habe ihre Menge entweder durch Wägung oder durch eine N-Bestimmung nach Kjeldahl ermittelt.

Der mit Äther extrahierte Harn wird nun mit Bleiessig vollständig ausgefällt, mit Ammoniak alkalisch gemacht und 12 Stunden stehen gelassen. Das Filtrat vom Bleiniederschlag wird mit  $H_2S$  entbleit und auf 100—200 ccm eingedampft. Nach vorsichtigem Neutralisieren und Alkalischemachen mit 2 ccm  $n/4$  KHO wird mit 2—4 g in ca. 20—40 ccm Äther gelösten  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorides 8 Stunden lang geschüttelt, wobei öfters zu kontrollieren ist, ob die alkalische Reaktion der wässrigen Flüssigkeit erhalten ist (eventuell weiterer Zusatz von  $n/4$  KHO).

Nach dem Schütteln wird die wässrige Flüssigkeit im Scheidetrichter vom Äther getrennt, nochmals mit Äther ausgeschüttelt, und dann angesäuert.

Aus dieser angesäuerten Flüssigkeit nimmt Äther die  $\beta$ -Naphthalinsulfoaminosäuren auf. Besser scheint nach meinen Versuchen die Ausbeute zu werden, wenn man diese saure wässrige Flüssigkeit mit nicht zu kleinen Mengen gepulverten Ammonsulfates versetzt. Das Ammonsulfat salzt die Naphthalinsulfoaminosäuren aus und man findet, auch dann, wenn ohne diesen Zusatz nach längerem Stehen keine Kristalle ausgefallen sind, in verhältnismäßig kurzer Zeit solche in der Flüssigkeit schwimmen. (Besonders schön ist diese Wirkung des Ammonsulfates zu sehen bei Alaninzusatz zum Harn, da gerade die Verbindungen dieser Aminosäure aus Harn langsam oder gar nicht kristallisieren.)

Aus dieser ammoniumsulfathaltigen Flüssigkeit scheint auch der Äther die Aminosäurenverbindungen quantitativ zu extrahieren. Jedenfalls ist aber ein sehr oft wiederholtes Ausschütteln mit Äther (nicht unter zehnmal) notwendig. Die aus dem Ätherextrakt entstehenden Kristalle werden in heißem Alkohol gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Ich habe sie dann in Wasser aufgeschwemmt, mit etwas Baryt versetzt und eingedampft, um Ammonverbindungen zu entfernen und beigemengten Harn-

stoff zu zersetzen. Dann wurde der N-Gehalt derselben nach Kjeldahl bestimmt.

Leider ist die Ausbeute nach dieser Methode nicht eine quantitative zu nennen. Meine Zahlen, die ich nach Zusatz gewogener Mengen, von mir selbst durch mehrmaliges Umkristallisieren gereinigter Aminosäuren (Glykokoll, Alanin, Leucin und Tyrosin) erhalten habe, folgen weiter unten.

Ignatowski findet 80% Glykokoll, aber bloß 40% Alanin und 50% Leucin wieder — die Ausbeute bei Tyrosin ist nicht angegeben —, während bei E. Fischer und Bergell die Ausbeute an  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin 85%, an der entsprechenden Alaninverbindung 90%, an der Leucinverbindung 74% der Theorie betrug.

In mehreren Versuchen mit normalem Harn fand ich folgendes:

1. 1000 ccm Harn enthielten 0,2014 g Hippursäure.  $\beta$ -Naphthalinsulfoaminosäuren fielen nicht aus, die Flüssigkeit blieb nach dem Ansäuern klar. Auch durch Extraktion derselben mit Äther konnten solche Verbindungen nicht gewonnen werden.

2. 1000 ccm Harn verbrauchten zur Sättigung des aus Hippursäure gewonnenen Ammoniaks 5,1 ccm  $\frac{1}{4}$  Normalsäure, sie enthielten demnach 0,2283 g Hippursäure. Auch in diesem Harn konnten andre Aminosäuren nicht nachgewiesen werden. Wenn man die Empfindlichkeit der Reaktion berücksichtigt, sind weder Ignatowskis noch meine Versuche beweisend. (Ich bin damit beschäftigt, in großen Mengen normalen Harnes nach Entfernung der Hippursäure und der durch Bleiessig fällbaren Stoffe unter Verwendung der Fischerschen Estermethode nicht gepaarte Amidosäuren aufzusuchen.)

Meine Versuche zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Methode ergeben nämlich folgende Resultate:

1. <sup>1)</sup> Von 0,3366 g zu 1000 ccm Harn zugesetzten Glykokolls <sup>2)</sup> (entsprechend 0,06283 g N) werden 0,2944 g Gly-

<sup>1)</sup> Die angeführten Versuche sind die beststimmenden einer ganzen Reihe ähnlicher.

<sup>2)</sup> Das Präparat verdanke ich der Güte meines Chefs, Herrn Prof. v. Jaksch.

kokoll (resp. 0,05495 g N) wiedergefunden. Das entspricht einer Ausbeute von **80,04** %.

2. Von 0,3865 g zu 1000 ccm Harn zugesetzten Alanins (entsprechend 0,0608 g N) werden 0,2492 g Alanin (resp. 0,0392 g N) wiedergefunden.

Ausbeute **64,4** %.

3. Von 0,851 g Leucin (mit 0,0910 g N), das zu 1000 ccm Harn zugesetzt wurde, wurden zurückgewonnen 0,4912 g Leucin (resp. 0,0525 g N).

Ausbeute daher **57,7** %.

4. Von 0,387 g Tyrosin (mit 0,0299 g N) wurden 0,271 g (resp. 0,0210 g N) wiedergefunden.

Ausbeute daher **70** %.

Wenn ich meine Ausbeuten mit denen Ignatowskis vergleiche, so finde ich sie bezüglich des Glykokolls gleich, des Leucins etwas, des Alanins bedeutend besser. Die Differenzen dürften daher rühren, daß ich die angesäuerte und mit größern Mengen Ammonsulfat versetzte Flüssigkeit bis zehnmal mit frischem Äther durchschüttelte, da ich mich überzeugte, daß noch im 7. und 8. Ätherextrakt Kristalle der Aminosäurenverbindungen sich bildeten.

Trotzdem glaube ich nicht, daß man mit dieser Methode der Aminosäurenbestimmung zufrieden sein dürfe. Eine Ausbeute von 50—80% kann eine quantitative wohl nicht genannt werden.

Weitere Untersuchungen werden lehren, ob diese Methode für die Anwendung auf den Harn soweit wird vervollkommenet werden können, daß man sie in die Reihe der quantitativen Methoden wird aufnehmen können.