

# Über einen im normalen menschlichen Harn vorkommenden, schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling.

Von

**Emil Abderhalden und Fritz Pregl, Graz.**

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

(Der Redaktion zugegangen am 2. August 1905.)

Es ist schon lange bekannt, daß im menschlichen Harn außer den bekannten kristallinen Harnbestandteilen sich noch kolloidale stickstoffhaltige Substanzen vorfinden. Ihre Menge ist so groß, daß durch ihr Vorkommen der scheinbare Widerspruch, der zwischen dem auf direktem Wege ermittelten Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff und dem aus den isolierten, kristallinen Bestandteilen berechneten besteht, befriedigend aufgeklärt wird.<sup>1)</sup> Über die Natur dieser Harnbestandteile war bis heute so gut wie nichts bekannt, und ebenso fehlt irgend ein haltbarer Beweis für ihre Einheitlichkeit.

Um zu prüfen, ob sich Beziehungen zwischen diesen stickstoffhaltigen Harnbestandteilen und den Eiweißkörpern feststellen lassen, wurde eine Hydrolyse derselben durchgeführt, und tatsächlich gelang es, nach der Estermethode Leucin, Alanin, Glycocoll und Glutaminsäure zu isolieren und die Anwesenheit von Phenylalanin durch die Reaktion mit Schwefelsäure und Kaliumdichromat festzustellen. Auch Asparaginsäure dürfte vorhanden sein.

## Experimenteller Teil.

Verwendet wurde ein Präparat, das der eine von uns schon vor Jahren in nachstehender Weise hergestellt hatte. Der Trockenrückstand von menschlichem Harn, in dem weder mit

<sup>1)</sup> Fritz Pregl, Über die Ursache der hohen Werte des C/N-Quotienten im normalen menschlichen Harn, Pflügers Archiv, Bd. LXXV, S. 87, 1899.

Esbachschem Reagens, noch mit konzentrierter Salpetersäure Eiweiß nachgewiesen werden konnte, wurde mit absolutem Alkohol extrahiert, und aus dieser Lösung durch Eintragen von gepulverter Oxalsäure die Hauptmenge des Harnstoffs entfernt. Aus dem Filtrat vom Harnstoffoxalat wurde die überschüssige Oxalsäure mit Baryt, und aus dem neuerlichen Filtrat der Baryt mit Schwefelsäure entfernt. Durch mehrtägige Dialyse des Filtrates vom Baryumsulfat wurden die letzten Reste kristallinischer Substanzen möglichst entfernt. Nach dem Einengen der dialysierten Flüssigkeit auf ein kleines Volumen stellt dieses Präparat eine durchsichtige, bräunliche, sirupöse Flüssigkeit dar.

Durch Schütteln der alkalischen Lösung mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid konnten wir uns überzeugen, daß das Präparat keine freien Aminosäuren enthielt. Eine Menge desselben, die etwa 30 Litern Harn entsprach, wurde mit einem Liter konzentrierter Salzsäure während 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dabei entwickelte sich ein höchst unangenehmer, penetranter Geruch, und reichliche Mengen eines schwarzen, unlöslichen «Melanins» schieden sich aus. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde hierauf mehrere Stunden lang der Dampfstromdestillation unterworfen, wobei die Riechstoffe ins Destillat übergingen. Durch Ausschütteln des Destillates mit Äther und Abdestillieren desselben war ein sofort kristallinisch erstarrender, penetrant riechender Rückstand zu erhalten, der noch weiter getrennt werden konnte. Beim Ausschütteln seiner ätherischen Lösung mit ammoniakalischem Wasser blieb im Äther ein stark riechendes Öl zurück, welches seiner geringen Menge wegen nicht weiter untersucht werden konnte. Die ammoniakalische wässrige Lösung wurde hierauf angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Destillationsrückstand erstarrte sofort kristallinisch; nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurden perlmutterglänzende Schüppchen einer bei  $117^{\circ}$  schmelzenden Säure erhalten, deren Analysenwerte und Verhalten auf Benzoesäure schließen lassen. Ihre Menge betrug 0,3 g.

Die salzsaure Hydrolysenflüssigkeit wurde hierauf eingengt, mit Wasser verdünnt und filtriert. Die Menge des

Filtrerrückstandes betrug nach dem Lösen in Natronlauge und Wiederausfällen mit Salzsäure 12 g.

Das Filtrat der ausgeschiedenen Massen wurde hierauf zur Sirupdicke eingeeengt, in der üblichen Weise zweimal verestert, die in Freiheit gesetzten Ester in Äther aufgenommen, der Äther abdestilliert, und der Rückstand bei einem Druck von 0,4 mm der fraktionierten Destillation unterworfen. Die erste Fraktion wurde bis 107° aufgefangen, die zweite bis 170°.

Die erste Esterfraktion wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit der 5fachen Wassermenge verseift und zur Trockene eingedampft. Durch fraktionierte Kristallisation konnte daraus als schwerlöslicher Anteil Leucin (0,3 g) vom Schmelzpunkt 293° isoliert werden.

0,1200 g Substanz gaben 0,2415 g CO<sub>2</sub> und 0,1062 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>:

54,96% C und 9,92% H.

Gefunden:

54,9% C und 9,8% H.

Das Filtrat davon zur Trockene verdampft und mit Alkohol und Salzsäure neuerlich verestert, schied beim Stehen im Eisschrank Glycocollesterchlorhydrat (1,1 g) aus.

0,1556 g Substanz lieferten 0,0968 g H<sub>2</sub>O und 0,1968 g CO<sub>2</sub>

Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>Cl:

34,4% C und 7,17% H.

Gefunden:

34,49% C und 6,96% H.

Aus den Mutterlaugen vom Glycocollesterchlorhydrat wurde die Salzsäure durch Kochen mit Bleioxyd entfernt, und die Lösung nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff eingeeengt. Aus dem Rückstand konnte durch Umkristallisieren Alanin (F = 294) (0,5 g) isoliert werden.

0,1607 g Substanz lieferten 0,2353 g CO<sub>2</sub> und 0,1164 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

40,42% C und 7,92% H.

Gefunden:

39,93% C und 8,10% H.

Die zweite Fraktion, die voraussichtlich die Ester des Phenylalanins, der Glutaminsäure und der Asparaginsäure enthielt, wurde in der bekannten Weise zur Abscheidung des Phenylalaninester mit dem fünffachen Volumen Wasser übergossen und dann mit Äther ausgeschüttelt. Nachdem der Äther zur Abtrennung von mitgelöstem Glutaminsäure- und Aspara-

ginsäureester mehrere Male mit Wasser ausgewaschen worden war, wurde er mit Natriumsulfat getrocknet und dann abdestilliert. Der Rückstand wurde, wie üblich, mit konzentrierter Salzsäure eingedampft, das salzsaure Salz durch Abdampfen mit Ammoniak zerlegt, und das gebildete Chlorammon mit kaltem Wasser ausgelaugt. Leider reichte die isolierte reine Säure zu einer Analyse nicht aus. Sie zeigte alle Eigenschaften des Phenylalanins und entwickelte namentlich beim Kochen mit 25%iger Schwefelsäure und einem Körnchen Kaliumbichromat deutlich Phenylacetaldehyd.

Die vereinigten wässerigen Extrakte wurden mit Baryt gekocht. Nach dem Abkühlen und längerem Stehen schied sich am Boden des Gefäßes ein schwerlösliches Barytsalz in Kristalldrüsen aus, das abfiltriert und mit Schwefelsäure zerlegt wurde. Nach der quantitativen Entfernung der Schwefelsäure wurde die Lösung eingedampft. Es kristallisierte eine sauer schmeckende Verbindung aus, die offenbar Asparaginsäure war. Leider reichte die isolierte Menge zur Analyse nicht aus. Aus dem Filtrat dieses Barytsalzes wurde der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ ausgefällt, das Filtrat vom schwefelsauren Baryt stark eingeengt, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und in die Kälte gestellt. Es erfolgte bald reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat (0,8 g).

0,1835 g Substanz gaben 0,2178 g  $\text{CO}_2$  und 0,0929 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{Cl}$ :

32,68% C und 5,49% H.

Gefunden:

32,37% C und 5,62% H.

Der vorliegende Befund beweist, daß im normalen menschlichen Harn Verbindungen vorkommen, welche bei ihrer Hydrolyse durch Säuren wenigstens einen Teil der im Eiweißmolekül vorhandenen Bausteine ergeben. Daß die isolierten Aminosäuren in fester Bindung vorhanden waren und nicht einzeln, beweist einmal der Umstand, daß das Produkt dialysiert worden war, und ferner durch Schütteln mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid keine Aminosäuren direkt nachgewiesen werden konnten. Wir haben den Basengehalt und die schwefelhaltigen Produkte noch nicht bestimmt und auch eine wahrscheinlich vorhandene Kohlehydratgruppe vorläufig unberücksichtigt gelassen. Was die

Deutung des Befundes anbetrifft, so liegt offenbar ein eiweißartiger Abkömmling vor, der dem totalen Abbau entgangen ist. Auffallend ist vor allem, daß von den Abbauprodukten der, wie oben beschrieben, isolierten Substanz das Glycocoll an Menge alle anderen Aminosäuren bei weitem übertraf. Allerdings haben wir zu gleicher Zeit Benzoesäure nachgewiesen. Man könnte deshalb daran denken, daß trotz der sorgfältigen Dialyse Hippursäure dem isolierten Produkte beigemischt war, und diese die Quelle des Glycocolls sein könnte. Gegen diese Auffassung ist anzuführen, daß Benzoesäure nur in verschwindend kleiner Menge isoliert werden konnte, und daher sicher nur der aller kleinste Teil des gewonnenen Glycocolls auf Hippursäure zurückgeführt werden darf. Der auffallend hohe Gehalt an Glycocoll, ferner der Gehalt an Phenylalanin (auf Prolin ist nicht geprüft worden) legen uns den Gedanken nahe, daß dem isolierten Eiweißabkömmling eine analoge Bedeutung zukommen könnte, wie dem von E. Fischer und E. Abderhalden<sup>1)</sup> bei der künstlichen und von E. Abderhalden<sup>2)</sup> bei der natürlichen Verdauung beobachteten sog. «Polypeptid».

Weitere Untersuchungen müssen ergeben, ein wie großer Teil des auf die beschriebene Art isolierten Produktes aus diesen Verbindungen besteht, und ob diese regelmäßig im menschlichen Harn vorkommen. Eine weitere Entscheidung über die Natur dieser Verbindungen erwarten wir von der biologischen Methode.

---

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, H. 1, S. 81, 1903, und Über die Verdauung des Caseins durch Pepsin-salzsäure und Pankreasfermente, Ebenda, Bd. XL, S. 215, 1903.

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden, Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 17, 1905.