

Über das Vorkommen von freien Aminosäuren im Harn und deren Nachweis.

Von

Dr. **Gunnar Forssner**, Stockholm.

(Aus der II. medizinischen Klinik zu München, Direktor Prof. Dr. Friedr. Müller.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Januar 1906.)

Ignatowski¹⁾ hat mit der β -Naphthalinsulfochloridmethode bei verschiedenen krankhaften Zuständen freie Aminosäuren im Harn nachgewiesen, und besonders hat er dabei festgestellt, daß bei der Gicht Glycocoll regelmäßig im Harn vorkommt. In 7 von 7 Fällen hat er β -Naphthalinsulfochloridglycocoll aus dem Harn isolieren können (durchschnittlich 100—200 mg pro Tagesmenge), und in 3 von diesen Fällen hat er daneben auch andere Aminosäuren, wahrscheinlich Leucin und Asparaginsäure, nachgewiesen.

Auf Vorschlag Herrn Prof. Müllers habe ich mit der genannten Methode Untersuchungen vorgenommen, zunächst mit der Aufgabe, zu erforschen, ob die Ausscheidung von Aminosäuren für die Differentialdiagnose der Gicht von einigem Wert wäre.

Ignatowski hat die ursprüngliche Methode von E. Fischer und P. Bergell etwas modifiziert und bei den Versuchen, welche ich zum oben erwähnten Zwecke anstellte, folgte ich im Anfang genau den Vorschriften Ignatowskis.

In aller Kürze erwähnt, ist das Vorgehen nach Ignatowski folgendes: Der Harn wird mit Blei gefällt, mit Schwefelwasserstoff entbleit, im Vacuum bei 45° etwa zur Hälfte des anfänglichen Volumens eingeeengt und nach Zusatz von Salzsäure mit Äther geschüttelt; man alkalisiert mit Kalilauge und schüttelt während 9 Stunden mit β -Naphthalinsulfochlorid in

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, II. 4.

ätherischer Lösung, säuert den Harn mit Salzsäure an und nimmt die Fällung in Äther auf; der Harn wird wieder alkalisch gemacht und nochmals 6 Stunden mit dem Reagens geschüttelt, dann wieder mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die beiden Ätherportionen werden vereinigt, der Äther abgedampft, und die eventuell gebildeten Aminosäureverbindungen durch wiederholtes Umkristallisieren aus heißem 20% igeu Alkohol rein dargestellt.

Bei dem Arbeiten nach diesen Vorschriften stieß ich indessen auf einige Schwierigkeiten und ehe ich auf die Hauptfrage eingehe, halte ich es deshalb für zweckmäßig, einige Erfahrungen die Methode betreffend kurz zu erwähnen. Zwar bin ich mir dabei bewußt, wenig Neues mitzuteilen, aber vielleicht kann ich doch anderen Untersuchern, welche die Methode einüben wollen, einigen Nutzen gewähren.

Besonders muß ich hervorheben, daß das Amid der β -Naphthalinsulfonsäure in vielen Fällen beim Umkristallisieren des Ätherrückstandes aus heißem Alkohol erheblich stört. In jedem normalen Harn ist Ammoniak in genügender Menge vorhanden, um beträchtliche Quantitäten von Amid zu geben (wenn die Reaktion quantitativ wäre, nicht weniger als 3 g pro 500 ccm Harn.)¹⁾ Bei Anwesenheit von freien Aminosäuren im Harne, enthält der Ätherrückstand also ein Gemisch von Amid und den β -Naphthalinsulfoverbindungen der Aminosäuren. Zwar beweisen nun die Untersuchungen von Ignatowski und anderen zur Genüge, daß man durch wiederholtes Umkristallisieren dieses Gemisches aus heißem Alkohol das Amid entfernen und die Aminosäureverbindungen rein herausbekommen kann, aber dazu gehört gewiß eine nicht ganz leicht gewonnene Übung. Ehe man die Löslichkeitsverhältnisse des Amids einerseits und der Aminoverbindungen andererseits genau kennen gelernt hat, kann es sogar vorkommen, daß man aus einem Gemisch von viel Amid und wenig Aminosäureverbindungen zuletzt das Amid rein bekommt und die Säureverbindungen verliert.

Jedenfalls wird man im allgemeinen erst durch häufig wiederholtes Umkristallisieren das Amid los, da dieses doch

¹⁾ Berechnet nach 0,7 g NH_3 und 1500 ccm pro Tag.

in heißem 20%igen Alkohol ziemlich löslich ist, und es wäre deshalb ein Vorteil, wenn man das Amid auf einmal durch eine bequeme und sichere Methode entfernen könnte.

Um dies zu erreichen, habe ich verschiedenes versucht. Zuerst lag es nahe, vor der Schüttelung mit β -Naphthalinsulfchlorid das Ammoniak aus dem Harn zu entfernen. Zu diesem Zwecke habe ich beim Einengen des Harnes (im Vacuum bei 45°) Kalkmilch zugesetzt und wiederholt gefunden, daß diese Methode zum Ziele führt: d. h. es bildet sich während der Schüttelung kein Amid, was daraus hervorgeht, daß der ganze Ätherrückstand in schwachem Ammoniak schon in der Kälte löslich ist (vgl. unten). Schon diese Tatsache beweist zur Genüge, daß kein neues Ammoniak (durch Zersetzung des Harnstoffes) sich während der Schüttelung bildet, aber auch durch direkte Versuche habe ich mich davon überzeugt. 900 ccm Harn wurden bis 400 ccm eingengt und 5 ccm zur NH_3 -Bestimmung nach Schloesing abgenommen: den Rest teilte ich in 3 gleiche Teile, A, B und C, und setzte zu jeder Portion KOH bis zu neutraler Reaktion aus der Bürette zu. A wurde mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure, B mit 20 und C mit 30 ccm N.-KOH versetzt; A 3 Stunden, B 9 und C 15 Stunden lang geschüttelt. Nach beendeter Schüttelung machte ich die Schloesing-Bestimmung mit 5 ccm von jeder Portion. Die Resultate der 4 NH_3 -Bestimmungen waren folgende (nach Korrektion der Zahlen je nach der Verdünnung des Harnes durch Zusatz von Salzsäure bzw. Alkali):

5 ccm vor der Schüttelung	= 5,2 ccm $\text{n}/_{10}$ -Lösung
A. 5 » 3 Stunden in saurer Lösung geschüttelt	= 4,45 » »
B. 5 » 9 » » alkalischer » »	= 4,7 » »
C. 5 » 15 » » » » »	= 4,4 » »

Ein weiterer Versuch, ebenfalls mit zur Hälfte eingengtem Harn, ergab:

5 ccm vor der Schüttelung	= 9,35 ccm $\text{n}/_{10}$ -Lösung
5 » 20 Stunden in alkalischer Lösung geschüttelt	= 7,8 » »
5 » 40 » » » » »	= 8,3 » »

Weder in saurer, noch in alkalischer Lösung wird also Ammoniak während der Schüttelung gebildet.

Wie gesagt, habe ich auch mit der in Rede stehenden

Methode — Entfernen des Ammoniaks vor der Schüttelung durch Zusatz von Kalkmilch beim Einengen des Harnes — gute Resultate erzielt. Aber das Einengen in alkalischer Lösung ist ziemlich unbequem, da die Flüssigkeit sehr leicht überschäumt, und deshalb habe ich einen anderen Weg zur Vermeidung der durch das Amid gegebenen Schwierigkeit gesucht und auch gefunden.

Von der Tatsache ausgehend, daß das Amid im Gegensatz zu den Aminosäureverbindungen keine freie COOH-Gruppe enthält, habe ich versucht, die Aminosäureverbindungen in Form von löslichen Salzen von dem Amid zu trennen. Zuerst behandelte ich zu diesem Zwecke die Ätherrückstände mit stark verdünntem NaOH, aber es zeigte sich, daß auch das Amid in dieser Flüssigkeit etwas löslich war, obgleich ja von Salzbildung nicht die Rede sein konnte. Sehr gute Resultate bekam ich dagegen mit verdünntem Ammoniak. Wenn man den Ätherrückstand mit einer kleinen Menge kalten Wassers übergießt und Ammoniak zusetzt, bis die Lösung gegen Lackmus eben schwach alkalisch reagiert, gehen die Aminosäureverbindungen als Ammoniumsalze sofort in Lösung, währenddem das Amid ungelöst bleibt. Die Entfernung des Amids gelingt in dieser Weise bei Versuchen mit reinen Verbindungen quantitativ oder fast quantitativ — 125 mg Glycocollverbindung wurden mit 151,5 mg Amid gemischt und das Gemisch auf oben erwähnte Weise mit verdünntem Ammoniak behandelt: auf dem Filter fand ich 150,5 mg Amid (Schmelzpunkt 214°) = 99,3% zurück, und aus dem Filtrat erhielt ich 118 mg Glycocoll (Schmelzpunkt 156°) = 94,4% — und in praxi ist die Abtrennung des Amids jedenfalls scharf genug. — Das ungelöste Amid ist oft sehr fein verteilt, geht leicht durch das Filter mit hindurch: man läßt daher zweckmäßig die Mischung auf Eis stehen, bis das Ungelöste sich gut abgesetzt hat, und filtriert dann durch Saugfilter; auch vom Schütteln mit spanischer Erde habe ich guten Erfolg gehabt.

(Als diese Versuche schon im Gang waren, berichtete Embden auf dem Kongresse f. inn. Med. zu Wiesbaden d. J. von guten Resultaten mit derselben Methode.)

Nachdem das Amid durch Filtrieren abgetrennt worden ist, wird das ganz klare Filtrat zweckmäßig in einen kleinen Kolben gegossen und mit Salzsäure gefällt. Die Fällung besteht bei Anwesenheit von Aminosäureverbindungen teils aus Krystallen, teils (fast immer) aus einer kleineren oder größeren Menge bräunlicher Schmiere und klebt in den meisten Fällen ziemlich fest an den Boden des Kolbens. Nachdem sie sich gut abgesetzt hat, filtriert man und kocht Kolben und Filter wiederholt mit kleinen Mengen Wasser aus, und zwar muß man dabei sehr gründlich vorgehen, denn die Schmiere hält die an sich in kochendem Wasser ziemlich gut löslichen Aminosäureverbindungen lange zurück. — Nach 1—4maligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser bekommt man die Krystalle rein. Beim Filtrieren sind dabei immer Saugfilter zu benützen, da die Flüssigkeit beim Abkühlen ziemlich schnell Krystalle ausscheidet. Ich habe Wasser anstatt verdünnten Alkohols zur Reinigung der Verbindungen gewählt, da bei Anwendung von Alkohol die Überreste von Schmiere noch leichter durch das Filter mit durchgehen.

Das Vorgehen nach Ignatowski ist ja ziemlich zeitraubend, und es wäre daher ein Vorteil, wenn man eine oder einige von den Prozeduren auslassen könnte. Aus diesem Grunde habe ich Parallelversuche mit und ohne Bleifällung angestellt, leider doch ohne ganz übereinstimmende Resultate zu erhalten. Nach Zusatz von 200 mg Glycocoll zu 1 l Harn erhielt ich aus der einen Hälfte, welche mit Blei gefällt wurde, 93 mg β -Naphtalinsulfoglycocoll, aus der anderen, ohne Bleifällung, 96 mg, und in zwei entsprechenden Versuchen mit Zusatz von 400 mg Glycocoll zu 1 l Harn nach Bleifällung 298 bzw. 293 mg Verbindung, ohne Bleifällung 273 bzw. 218 mg. Die Ausbeute dürfte also nach Fällen mit Blei doch etwas besser sein.

Da Ignatowski zuletzt die β -Naphtalinsulfoverbindungen aus saurer Lösung in Äther aufnimmt, hat er vorgeschlagen, den Harn vor der Schüttelung mit β -Naphtalinsulfochlorid anzusäuern und 3 Stunden lang mit Äther auszuschütteln, um die von vornherein anwesenden ätherlöslichen Bestandteile

des Harns los zu werden. Ohne Zweifel gewinnt man dadurch den Vorteil, daß man beim Aufnehmen der β -Naphtalin-sulfoverbindungen in Äther immer eine dünnflüssige Ätherschicht bekommt, währenddem der Ätherextrakt ohne diese vorgehende Ausschüttelung nicht selten mehr oder weniger emulsionsartig wird. Nach meiner Erfahrung entgeht man aber der letzt-erwähnten Schwierigkeit leicht dadurch, daß man etwas größere Äthermengen nimmt und eventuell den im Scheidetrichter abgetrennten Äther kräftig schüttelt. Die Beimischung von anderen ätherlöslichen Bestandteilen hat bei dem Krystallisieren des Ätherrückstandes nicht gestört. Ich glaube daher, daß man die erste Ätherausschüttelung Ignatowski's ohne Schaden auslassen kann.

Einige Untersucher scheinen es vorzuziehen, die β -Naphtalin-sulfoverbindungen nach dem Ausfällen des mit dem Reagens geschüttelten Harnes mit Salzsäure sich absetzen zu lassen, anstatt sie in Äther aufzunehmen. Nach meiner Erfahrung setzen sich die Niederschläge indessen in vielen Fällen nur äußerst langsam ab, und ich habe daher, da ich mich durch Parallelversuche überzeugt habe, daß die Ausbeute in der Tat schlechter wird, von diesem Verfahren Abstand genommen.

Ignatowski fand in den von ihm untersuchten Harnen ganz vorwiegend Glycocoll und verhältnismäßig nur sehr selten andere Aminosäuren, und wie ich erwähnen werde, ergaben meine Versuche dasselbe Resultat. Es war daher von größter Wichtigkeit, die an sich nicht ganz unwahrscheinliche Möglichkeit ausschließen zu können, daß die Hippursäure durch die langdauernde Schüttelung in alkalischer Lösung sich spaltet und somit freies Glycocoll abgibt; da die Untersuchungen außerdem meistens Gelenkranke betrafen, von denen viele mit Salicylsäure oder anderen Salicylpräparaten behandelt wurden, kam ganz besonders auch die Salicylsäure in dieser Beziehung in Betracht. Ignatowski hat die erwähnte Möglichkeit klar ins Auge gefaßt, und hat durch wiederholte Versuche gezeigt, daß reine Hippursäure sich bei der Schüttelung nicht spaltet; er hat große Mengen von dieser Säure sowohl zu Wasser als zu glycocollfreiem Harn zugesetzt und die Lösungen mit Alkali

und β -Naphthalinsulfochlorid geschüttelt, ohne eine Spur von Glycocoll zu erhalten. Ich habe nun durch entsprechende Versuche seine Resultate bestätigt und habe außerdem bei Behandlung der Harnen genau nach den im Anfang mitgeteilten Vorschriften das Glycocoll vermisst, einmal nach Einnahme von 4 g Benzoesäure und wiederholt nach Einnahme von 4—6 g Salicylsäure. Man dürfte es also für völlig erledigt halten können, daß das Glycocoll bei dem von uns verwendeten Verfahren weder aus Hippursäure noch aus Salicylursäure stammen kann.

Was nun die Ausbeute betrifft, welche ich nach den oben erwähnten kleinen Modifikationen in meinen Versuchen erzielt habe, ist diese leider keineswegs eine günstige. Nach Zusatz von 200 mg Glycocoll zu 500 ccm glycocollfreien Harnes habe ich in drei Versuchen 182 bzw. 183 und 226 mg Verbindung zurückgefunden, was 26—32% der Theorie entspricht. In 2 Fällen von Lungentuberkulose habe ich nach Zusatz von ebenfalls 200 mg Glycocoll zu 500 ccm Harn 206 bzw. 298 mg Verbindung (= 29,4—42,5%) gefunden; diese Harnen waren aber nicht vorher auf Glycocoll geprüft, und das scheinbar verhältnismäßig sehr gute Resultat im 2. Versuch kann also vielleicht seine Erklärung darin haben, daß der Harn an sich Glycocoll enthielt. Abderhalden und Bergell¹⁾ geben an, nach Zusatz von 200 mg Glycocoll zu 100 ccm Harn mit der β -Naphthalinsulfochloridmethode (und wiederholtem Umkrystallisieren der Reaktionsprodukte aus warmem 20%igen Alkohol, ohne vorgehendes Abtrennen des Amids) 200 mg Verbindung erhalten zu haben; wie man sieht, stimmen ihre Resultate mit den meinen sehr gut überein. Wesentlich verbessert das Abtrennen des Amids durch verdünntes Ammoniak also die Ausbeute nicht. Doch muß ich hervorheben, daß meine Glycocollösungen weniger konzentriert waren als die Abderhalden's und Bergell's; ich arbeitete mit 200 mg Glycocoll auf 500 ccm (nachher bis zur Hälfte eingeengtem) Harn, Abderhalden und Bergell mit derselben Menge in 100 ccm; dabei war in meinen Versuchen also das Lösungsmittel auch reicher an fremden Bestandteilen als bei Abder-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 9.

halden und Bergell. Diese beiden Momente spielen sicherlich eine Rolle für die Größe der Ausbeute: nach Abderhalden und Bergell selber wird diese im Harn erst bei einem Glycocollgehalt von 1% ungefähr so wie in reinen Lösungen. — Beim Alanin ist die Ausbeute noch viel schlechter: nach Zusatz von 200 mg zu 500 ccm Harn habe ich nur 57 mg Verbindung (= etwa 9% der Theorie) erhalten können.

In der oben erwähnten Mitteilung auf dem Kongresse zu Wiesbaden hat Embden¹⁾ hervorgehoben, daß man nicht bei schwach, sondern bei stark alkalischer Reaktion schütteln soll, ferner daß man die Schüttelung mit β -Naphthalinsulfochlorid viel länger, als man es im allgemeinen früher getan hat, fortsetzen soll. Mittels dieser Modifikation der Methode sollen sich aus jedem normalen Harn sehr reichliche Reaktionsprodukte mit β -Naphthalinsulfochlorid gewinnen lassen; dieselben stellen ein Gemisch dar, in dem die β -Naphthalinsulfoverbindung des Glycocolls zu überwiegen scheint. Herr Dr. Embden hat mir lebenswürdigerweise durch Brief die näheren Details bei seinem Vorgehen mitgeteilt (eine ausführliche Publikation liegt noch nicht vor). Den Alkalizusatz betreffend hebt er als wesentliche Regel hervor, daß rotes Lackmuspapier die ganze Zeit, während welcher man schüttelt, deutlich blau und nicht nur violett gefärbt werden soll: als meine Erfahrung möchte ich dabei aussprechen, daß der Alkalizusatz, welchen ich von Anfang benutzt habe, meistens dieser Forderung entspricht (ich setzte zu jedem anfänglichen Volumen von 500 ccm neutralisiertem Harn 20 ccm N.-KOH zu, und fügte nach 3 und 6 Stunden noch 10 ccm zu; bei der zweiten 6 Stunden lang dauernden Schüttelung kamen noch 20 + 10 ccm zur Verwendung). Weiter schlägt Herr Dr. Embden vor, etwa 18 Stunden zu schütteln, danach mit Säure auszufällen, die Fällung in Äther aufzunehmen, den Harn wieder zu alkalisieren und nochmals 18 Stunden mit dem Reagens zu schütteln. Nach diesen Vorschriften Embden's habe ich nun sowohl einen normalen als auch einen mit Glycocoll versetzten Harn behandelt, und zwar mit folgenden Resultaten: Aus dem normalen Harn habe ich nach Abtrennen

¹⁾ Münch. Med. Wochenschrift, S. 1905, Nr. 19.

des Amids keine krystallinischen Produkte erhalten können: ob die nicht krystallinischen (schmierigen) Produkte sich in größerer Menge bildeten als in dem Parallelversuch mit Schüttelung 9 + 6 Stunden, muß ich dahingestellt sein lassen. Nach Zusatz von 200 mg Glycocoll zu 800 ccm Harn erhielt ich 220 mg Verbindung (= 32,5% der Theorie) gegen 183 mg (= 26%) im Parallelversuch, wo dieselbe Menge von demselben Harn mit 200 mg Glycocoll versetzt 9 + 6 anstatt 20 + 20 Stunden geschüttelt wurde.

Über die Frage, ob freie Aminosäuren regelmäßig im Harn ausgeschieden werden, habe ich folgende Erfahrungen gemacht: Im Harn eines 29jährigen gesunden Mannes habe ich weder nach Ignatowski noch nach Embden krystallinische Aminosäureverbindungen erhalten können, wohl aber Schmiere. Weiter habe ich bei Vorgehen nach Ignatowski durchaus negative Resultate oder so geringe Mengen von Krystallen, daß die Schmelzpunktbestimmung nicht möglich war, in folgenden Fällen erhalten: Bei einem Patienten mit chronischem und einem mit akutem Gelenkrheumatismus, bei einem etwa 50jährigen Mann, der keine anderen Abnormitäten zeigte, als daß der Harn regelmäßig ein Sediment von freier Harnsäure absetzte, und (bei einer Untersuchung) auch bei einem wegen Ischias im Krankenhause gepflegten 23jährigen Mann.

Bei demselben Ischiaspatienten konnte ich dagegen wenige Tage später 18 mg β -Naphthalinsulfoglycocoll pro Tagesmenge isolieren, und bei einem Neurastheniker habe ich nicht weniger als 172 mg derselben Verbindung in der Tagesmenge gefunden (sämtliche Krystalle, die ich aus dem Ätherrückstand erhalten hatte, löste ich in schwachem Ammoniak auf und fällte die Lösung mit BaCl_2 ; aus der Fällung erhielt ich mit Salzsäure die obengenannte Menge Glycocollverbindung und aus dem Filtrat außerdem 4 mg — auf die Tagesmenge umgerechnet 16 mg — von einer etwa bei 149° schmelzenden Verbindung). Auch in einem Falle von akutem Gelenkrheumatismus habe ich eine nicht unbeträchtliche Menge (die Krystalle verunglückten vor dem Wägen) von β -Naphthalinsulfoglycocoll nachweisen können.

Auf Grund dieser Beobachtungen glaube ich berechtigt

zu sein, auszusprechen, daß es zwar sehr möglich ist, daß freies Glycocoll in normalen Harnen oft vorkommt, regelmäßig ist die Glycocollausscheidung aber nicht. Und weiter: freies Glycocoll kommt bei sehr verschiedenen Krankheitszuständen im Harne vor.

Daß Glycocoll bei der Gicht in der Regel mit dem Harne ausgeschieden wird, ist durch die Untersuchungen Ignatowski's mit Sicherheit erwiesen; ob dies Verhältnis aber differentialdiagnostisch verwertbar ist, das war eine andere Frage, die erst durch fortgesetzte Untersuchungen beantwortet werden konnte, was Ignatowski in seiner Arbeit selbst hervorhebt.

Frühere Untersuchungen haben dargetan, daß freie Aminosäuren im Harne bei vielen Krankheiten — verschiedenen Leberkrankheiten, Leukämie, croupöser Pneumonie u. a. — vorkommen, und weiter habe ich nun verhältnismäßig ziemlich große Mengen von freiem Glycocoll bei Neurasthenie, Ischias und akutem Gelenkrheumatismus gefunden. Wenn auch das Glycocoll bei chronischem Gelenkrheumatismus noch nicht nachgewiesen worden ist, dürfte doch schon aus den eben erwähnten Befunden zur Genüge hervorgehen, daß der Nachweis von freiem Glycocoll im Harne für die Differentialdiagnose der Gicht gegenüber anderen Gelenkkrankheiten kaum einen Wert hat. Die Bedingungen, unter welchen Glycocoll im Harne auftreten kann, sind offenbar allzu vielfache. — Dazu habe ich noch hinzuzufügen, daß das Vorkommen von Glycocoll im Gicht-harne nicht ganz ohne Ausnahme ist. In einem Falle von typischer chronischer Gicht habe ich (bei einmaligem Untersuchen) kein Glycocoll gefunden, in einem anderen (ebenfalls chronischen) Fall habe ich einmal Glycocoll gefunden, einige Male dasselbe vermißt.

Sowohl für die Anregung zu dieser Untersuchung als für das Interesse, womit er meiner Arbeit gefolgt ist, sage ich Herrn Professor F. Müller meinen aufrichtigsten Dank; ebenso danke ich Herrn Dr. Otto Neubauer für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Untersuchungen.