

Über quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn.

Von
V. Henriques.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule, Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 31. März 1909.)

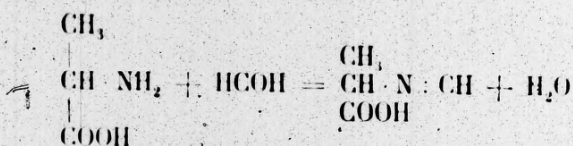
Das Vorhandensein von Aminosäuren im Harn ist nicht nur während pathologischer Zustände nachgewiesen worden — auch im normalen Harn kommen Aminosäuren vor; ob es sich hier nur um Glykokoll¹⁾ — die einzige Aminosäure, deren Nachweis im Harn gesunder Menschen bis jetzt gelungen ist — handelt, oder ob noch andere Aminosäuren vorhanden sind, müssen künftige Untersuchungen entscheiden. Was die quantitative Bestimmung der gesamten Menge der Aminosäuren betrifft, so finden sich in dieser Beziehung in der Literatur mehrere Vorschläge, unter denen der von Pfaundler angegebene am häufigsten zur Anwendung kommt.²⁾ Es läßt sich indes wohl von keiner der bisher angewandten Methoden behaupten, daß sie völlig zuverlässige Resultate gebe, und ich habe deshalb versucht, ob man nicht imstande sein möchte, mittels der von S. P. L. Sørensen³⁾ angegebenen Formoltitrierung sicherere Ergebnisse zu erzielen. Ich werde mich hier nicht näher auf die Einzelheiten dieser Titriermethode einlassen, sondern nur ins Gedächtnis zurückrufen, wie dieselbe sich darauf begründet, daß Zusatz neutralisierter Formollösung zur Lösung einer Aminosäure die Trennung der Amin- von der Säurefunktion be-

¹⁾ Siehe u. a. Gustav Embden und Alfred Marx, Über das Glykokoll des normalen Harnes. Hofmeisters Beiträge, Bd. XI, 1908.

²⁾ Siehe hierüber: E. C. van Leersum, Ausscheidung von Aminosäuren während der Schwangerschaft. Bioch. Zeitschrift, Bd. XI.

³⁾ S. P. L. Sørensen, Enzymstudien. Bioch. Zeitschrift, Bd. VII.

wirken wird, indem die Aminogruppe wegen des Einflusses des Formols eine Methylenverbindung bildet, wodurch es möglich wird, die Menge der vorhandenen Carboxylgruppen titrimetrisch zu bestimmen. Der Verlauf des Prozesses ist aus folgender Formel ersichtlich (Alanin + Formol):



Das von mir zur Bestimmung der Aminosäuremenge des Harns benutzte Verfahren wird — auf Vorschlag des Professors Sörensen¹⁾ — folgendermaßen ausgeführt:

In einem 100 ccm Maßkolben werden 50 ccm Urin abgemessen. Hierzu setzt man Phenolphthalein (1 ccm einer $\frac{1}{2}$ 0/0igen Lösung) nebst 2 g festes BaCl_2 . Nach Umrühren wird eine gesättigte Lösung von Ba(OH)_2 zu roter Farbe und darauf noch 5 ccm zugesetzt;²⁾ man füllt darauf bis 100 ccm an, schüttelt gut und läßt den Kolben ca. 15 Minuten lang stehen, worauf man durch einen trocknen Filter filtriert.

80 ccm des klaren roten Filtrats (40 ccm Harn entsprechend) werden in einen 100 ccm-Maßkolben gebracht, worauf man die Flüssigkeit durch Zusatz von $\frac{n}{5}$ -HCl mit Lackmuspapier³⁾ als Indikator bis auf 100 ccm verdünnt.

In gleich großen Teilen dieser Verdünnung (z. B. in 40 ccm, 16 ccm Harn entsprechend) bestimmt man in dem einen das Ammoniak, während der andere zur Formoltitrierung ad modum Sörensen benutzt wird.

¹⁾ Ich bitte den Herrn Prof. Sörensen auch an diesem Orte, meinen besten Dank für den mir stets so bereitwillig geleisteten wertvollen Beistand entgegenzunehmen.

²⁾ Der Grund, weshalb man BaCl_2 und Ba(OH)_2 zusetzt, ist der, daß man mittels dieses Zusatzes die Phosphate aus dem Harn entfernt, deren Vorhandensein nämlich bewirkt, daß die Titrierung mit Phenolphthalein weniger genau wird.

³⁾ Lackmuspapier wird zum Neutralisieren angewandt, weil Lösungen von Aminosäuren, die Monocarbonsäuren sind, auf Lackmus neutral reagieren, dasselbe gilt von Aminosäuren, die Dicarbonsäuren sind, wenn die eine Carboxylgruppe neutralisiert worden ist.

Was nun erst die Ammoniakbestimmung betrifft, so wandte ich ausschließlich Destillation im Vakuum nach Zusatz von Ba(OH)_2 an. Das Ammoniak wurde in $n_{14}\text{-H}_2\text{SO}_4$ angesammelt und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titriert, indem Jodstärke den Indikator abgab (Kjeldahl). Über dieses Verfahren zwecks der Ammoniakbestimmung liegen Untersuchungen vor von Krüger und Reich,¹⁾ Schittenhelm¹⁾ und Schaffer,²⁾ die sämtlich die Brauchbarkeit der Methode darlegen, und sämtliche von mir ausgeführten Doppelanalysen zeigen ganz vorzügliche Übereinstimmung.

Mit Bezug auf die Formoltitrierung begnüge ich mich mit dem Hinweis auf Sörensens oben erwähnte Abhandlung. Der Umschlag beim Titrieren ist ganz ausgezeichnet und die Bestimmung läßt sich mit einer Genauigkeit von $\pm 0,10$ ccm geben.

Als Beispiel des angewandten Verfahrens mag folgendes dienen:

Die im Laufe von 24 Stunden angesammelte Harnmenge eines Hundes betrug 360 ccm. Der Stickstoffgehalt war = 0,285 % . Zur Aminosäurebestimmung wurden 50 ccm angewandt, die wie oben genannt behandelt wurden. Mittels Titrierens fand man für 40 ccm (16 ccm Harn entsprechend) nach Zusatz von Formol eine Acidität = 6,9 ccm $n_5\text{-NaOH}$. Multipliziert man 6,9 mit 2,8 (siehe Sörensen l. c.), so erhält man die Menge von Aminosäurestickstoff + Ammoniakstickstoff, die also $6,9 \times 2,8 = 19,32$ wird. In anderen 40 ccm fand sich an Ammoniakstickstoff (durch Destillation im Vakuum) 14,3 mg. Die Menge des Aminosäurestickstoffs betrug also: $19,32 - 14,3 = 5,02$ mg. Eine Bestimmung der Ammoniakmenge des ursprünglichen Harns ergab, daß 15 ccm Harn 13,5 mg N enthielten; 16 ccm enthielten mithin 14,4 mg oder fast genau dieselbe Menge, die oben nach Behandlung des Urins mit BaCl_2 und Ba(OH)_2 gefunden wurde.

Das Resultat der angeführten Bestimmungen wird also, daß der Harn 10,260 g Totalstickstoff, 0,113 g Aminosäurestickstoff und 0,324 g Ammoniakstickstoff enthielt, was wieder heißt,

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XXXIX.

²⁾ Amer. Journal of Physiology, Bd. VIII. Man findet hier u. a. eine vorzügliche geschichtliche Darstellung der verschiedenen Methoden.

daß vom Totalstickstoff der Aminosäurestickstoff 1,1%, der Ammoniakstickstoff 3,2% betrug. Was die Ammoniakbestimmungen betrifft, hat es sich erwiesen, daß die durch direkte Bestimmung im Harn gefundene Menge in der Regel derjenigen Menge entspricht, die nach Zusatz von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und BaCl_2 zum Harn gefunden wird. Führt man daher stets beide Bestimmungen aus, so hat man die Zuverlässigkeit der Resultate einer guten Kontrollprobe unterworfen.

Betreffs der Genauigkeit der Methode begnüge ich mich damit, hier drei Analysen desselben Harns (Mensch) anzuführen. Die Analysen I und II wurden an dem Harn, wie er war, angestellt, die Analyse III dagegen wurde an Harn ausgeführt, der mit Toluol geschüttelt worden war, um zu untersuchen, ob dieses Verfahren die Bestimmung beeinflusste; es ist nämlich ein großer Vorteil, den Harn in Toluol enthaltenden Gläsern ansammeln zu können, da das Wachstum von Mikroorganismen hierdurch verhütet wird.

	Amino-N	Ammoniak-N	In % des Totalstickstoffes fand sich an	
			Amino-N	Ammoniak-N
I	0,042	0,062	2,4	3,5
II	0,041	0,062	2,4	3,5
III	0,041	0,062	2,4	3,5

Die angegebenen Zahlen wurden für 100 ccm Harn berechnet. An Totalstickstoff fand man im Harn (in 100 ccm): 1,730 g. In 20 ccm Harn fand man mittels direkter Bestimmung 12,4 mg Ammoniakstickstoff, was 0,062 g in 100 ccm Harn entspricht.

Daß man nicht immer auf eine so genaue Übereinstimmung rechnen darf, liegt in der Natur der Sache; die Zahlen zeigen indes, mit wie großer Genauigkeit derartige Analysen sich ausführen lassen.

Eine Frage von größter Bedeutung ist es selbstverständlich, ob sich im Harn noch andere Verbindungen als Aminosäuren befinden, die sich nach Formolzusatz titrieren lassen.

In dieser Beziehung mache ich darauf aufmerksam, daß nach Sörensen (l. c.) sowohl der Harnstoff als auch das Kreatin und das Kreatinin sich als völlig neutrale Stoffe verhalten. Auch das Vorhandensein von Hippursäure kann keinen Einfluß erhalten, da die Bindung des Glycins in der Hippursäure keinen Umsatz mit Formol gestattet; daß die Hippursäure ohne Bedeutung ist, geht übrigens aus Bestimmungen der Aminosäuren im Harn einer Ziege hervor; die Menge des Aminosäurestickstoffs in Prozenten des Totalstickstoffes war hier nicht unerheblich geringer, als die im Harn sowohl des Menschen als des Hundes angetroffene, nämlich nur 0,77% des Totalstickstoffes.

Ob sich im Harn Polypeptide vorfinden, ist noch nicht mit Sicherheit festgestellt worden. Finden sich solche Verbindungen, so ist die Zahl für die Menge des Aminosäurestickstoffs natürlich gar zu niedrig, und zwar um so niedriger, je mehr Aminosäuren aneinander gebunden vorkommen. Übrigens kann es kaum große Schwierigkeit bereiten, mittels der Formoltitrierung vor und nach dem Sieden mit starker Säure zu entscheiden, ob sich solche Polypeptide im Harn finden.

Um mir eine Vorstellung von der Menge der Aminosäuren im Harn unter verschiedenen Verhältnissen zu bilden, unternahm ich mehrere Analysen des Harns teils von Menschen, teils von Hunden und Ziegen. Obschon die Versuche als rein vorbereitende zu betrachten sind, gestatte ich mir doch, sie hier anzuführen, da sie mir die Anwendbarkeit der Methode sehr gut zu illustrieren scheinen.

Unter den Analysen des Harns von Menschen gebe ich hier nur vier an, die von einem gesunden Menschen auf gemischter Kost stammen.

	Harn- menge ccm	Total-N g	Amino- säure-N g	Am- moniak-N g	In % des Total-N wurden gefunden an	
					Amino- säure-N	Am- moniak-N
4. III. 09	692	13,632	0,301	0,631	2,2	4,6
5.	870	15,182	0,331	0,598	2,2	3,9
6.	830	13,903	0,315	0,617	2,3	4,4
7.	790	14,260	0,278	0,662	1,9	4,6

Aus den angeführten Zahlen ist ersichtlich, daß die Menge des Aminosäure-N, in Prozenten des Totalstickstoffs ausgedrückt, sehr wenig schwankt und um 2 herum liegt. Ferner erweist es sich, daß der Aminosäurestickstoff in den hier angeführten Analysen nahezu halb so viel beträgt wie der Ammoniakstickstoff.

Bei einem Ziegenbock, der sich bei einem aus 800 g Heu bestehenden Futter im Stickstoffgleichgewicht befand, ergaben sich folgende Zahlen:

Harnmenge = 315 ccm, Total-N = 6,631 g, Aminosäure-N = 0,051 g, Ammoniak-N = 0,031 g. Es fanden sich also 0,77% des Totalstickstoffes als Aminosäurestickstoff und 0,47% als Ammoniakstickstoff, bei diesem Tiere war mithin Ammoniak-N in geringerer Menge vorhanden als Amino-N.

Bei einem Ziegenbock, der zu Untersuchungen über die Bedeutung der Ammoniaksalze für Pflanzenfresser angewandt wurde, fanden sich bei einem Futter, das an stickstoffhaltigen Stoffen nur Citras ammoniacus enthielt, folgende Zahlen:

	Harn- menge ccm	Total-N g	Amino- säure-N g	Am- moniak-N g	In % des Total-N wurden gefunden an	
					Amino- säure-N	Am- moniak-N
26.	275	6,958	0,016	0,108	0,23	1,6
27.	425	11,475	0,027	0,178	0,24	1,6
28.	195	5,962	0,018	0,096	0,30	1,6
29.	245	7,032	0,041	0,107	0,58	1,5

Bei der Ziege finden wir also eine verhältnismäßig bedeutend geringere Menge Aminosäurestickstoff als beim Menschen trotz der großen Menge Hippursäure, die im Harne dieses Tieres angetroffen wird, ein indirekter Beweis, daß das Vorhandensein von Hippursäure bei der Formoltitrierung keine Rolle spielt.

Endlich untersuchte ich an einem ca. 5 kg wiegenden Hunde die Ausscheidung von Aminosäuren und Ammoniak im Harn bei verschiedener Fütterung. Das Futter bestand vom 16. 2.—23. 2. aus Weizenbrot, so viel der Hund fressen wollte. Vom 23. 2.—2. 3. wurden täglich 500 g Kalbfleisch gegeben;

darauf bekam der Hund 2 Tage lang nur Fett, wovon er nur wenig fraß: vom 4./3. an erhielt er darauf Glutenbrot, so viel er fressen wollte. Dieses Futter wurde bis zum 14. 3. gegeben, worauf der Hund ein kohlenhydratreiches Futter erhielt, das aus Stärke und Zucker nebst ein wenig Fett, während der ersten Tage (13—15) mit (von 125—50 g) abnehmenden Mengen Fleisch bestand, worauf das Futter vom 16./3. an völlig stickstofffrei wurde. Das Ergebnis der Analysen ist aus der Tabelle auf Seite 456 zu ersehen.

Eine nähere Betrachtung der Zahlen, welche die Menge des Aminosäurestickstoffs in Prozenten des Totalstickstoffs angeben, wird sofort zeigen, daß die Zahlen bei einem und demselben Futter nur sehr wenig von Tag zu Tag schwanken. Dagegen sieht man, daß die genannten Zahlen von einer Periode zur anderen bedeutend variieren. Berechnen wir der Übersicht wegen die Mittelzahlen für die Perioden, während deren das Futter aus Weizenbrot (16./2.—23./2.), bzw. Fleisch (23. 2. bis 2./3.), Glutenbrot (6./3.—14./3.) und stickstofffreier Nahrung (18./3.—22. 3.) bestand, so sehen diese Zahlen folgendermaßen aus:

	Anzahl der Tage	Harnmenge ccm	Total-N g	Amino-N g	Ammoniak-N g	In % des Total-N wurden gefunden		Futter
						Aminosäure-N	Ammoniak-N	
16.—23. II.	7	123	1,989	0,031	0,137	1,5	6,9	Weizenbrot
23. II.—2. III.	7	260	12,541	0,109	0,385	0,87	3,0	Fleisch
6.—14. III.	8	150	4,520	0,049	0,323	1,1	7,1	Glutenbrot
18.—22. >	4	175	0,587	0,018	0,154	3,1	26,2	N-freies Futter

Aus den angeführten Zahlen ist zu ersehen, erstens, daß die Menge des Aminosäurestickstoffs im Harne bei steigender oder abnehmender Menge des Totalstickstoffs ebenfalls steigt, bzw. abnimmt. Bei Fleischfütterung, wo der Totalstickstoff 12,5 g beträgt, finden wir 0,109 g, während wir bei N-freiem Futter, wo der Totalstickstoff bis auf ca. 0,6 g gesunken ist, nur 0,018 g Amino-N finden.

	Harn- menge	Total-N	Amino- säure-N	Am- moniak-N	In Prozent des Total-N wurde gefunden	
					ccm	g
16. II. 09	106	2,083	0,030	0,112	1,4	5,3
17.	110	1,821	0,030	0,124	1,6	6,8
18.	194	2,920	0,042	0,216	1,4	7,4
19.	115	1,248	0,017	0,069	1,4	5,5
20.	142	2,691	0,044	0,154	1,6	5,7
21.	46	1,152	0,019	0,097	1,6	8,4
22.	150	2,010	0,035	0,186	1,7	9,3
23.	360	10,260	0,113	0,322	1,1	3,2
24.	166	7,777	0,087	0,174	1,1	2,2
25.	246	12,706	0,125	0,399	0,98	3,1
26.	270	13,905	0,114	0,449	0,82	3,2
27.	154	8,301	0,067	0,283	0,81	3,4
28.	422	24,012	0,176	0,754	0,73	3,1
1. III.	200	10,828	0,079	0,315	0,73	2,9
2.	97	4,802	0,100	0,183	2,1	3,8
3.	91	4,068	0,050	0,241	1,2	5,9
4.	41	—	—	—	—	—
5.	48	—	—	—	—	—
6.	166	4,864	0,058	0,342	1,2	7,0
7.	118	3,280	0,029	0,258	0,9	7,9
8.	134	3,899	0,040	0,208	1,0	5,3
9.	155	4,899	0,056	0,419	1,1	8,6
10.	150	4,755	0,052	0,330	1,1	6,9
11.	145	4,800	0,051	0,315	1,1	6,6
12.	176	5,509	0,068	0,420	1,2	7,6
13.	155	4,154	0,037	0,296	0,9	7,1
14.	270	4,779	0,066	0,423	1,4	8,9
15.	107	1,503	0,021	0,189	1,4	12,6
16.	53	1,537	0,032	0,184	2,1	12,0
17.	23	—	—	—	—	—
18.	107	0,375	0,008	0,100	2,1	26,7
19.	306	0,689	0,032	0,236	4,6	34,4
20.	220	0,693	0,016	0,213	2,3	30,7
21.	65	0,589	0,014	0,067	2,4	11,4

Zweitens sieht man, daß, je höher der Totalstickstoff ist, diejenige Zahl, die den Aminosäurestickstoff in Prozenten des Totalstickstoffes angibt, um so niedriger wird. Bei Fleischfütterung beträgt das Vohundert 0,87, bei N-freiem Futter dagegen 3,1.

Endlich zeigt es sich, daß eine reichliche Menge Gliadin in der Nahrung (Glutenbrot) die prozentige Menge des Aminosäurestickstoffes im Harn nicht vermehrt. Es wäre nämlich denkbar, daß ein Teil der großen im Gliadin befindlichen Menge Glutaminsäure in unverändertem Zustande in den Harn überginge: dann würde man bei Fütterung mit Glutenbrot eine verhältnismäßig große Zahl für den Aminosäurestickstoff finden; wie gesagt, ist dies aber nicht der Fall.

Resümee.

1. Mittels der von Sörensen angegebenen Formoltitrierung läßt sich die Menge des Aminosäurestickstoffes im Harn mit hochgradiger Genauigkeit bestimmen.

2. Zugleich erzielt man durch diese Bestimmung auch die Bestimmung der Menge des Ammoniakstickstoffes.

3. Die Menge des Aminosäurestickstoffes, in Prozenten des Totalstickstoffes ausgedrückt, ist von der Menge des Totalstickstoffes abhängig. Beim Menschen betrug dieselbe bei gemischter Kost ca. 2%, bei der Ziege bei Heufütterung ca. 0,7%, beim Hunde fanden sich Mengen, die zwischen 0,73 und 4,6% schwankten.