

Über den Einfluß des Harnstoffs auf die Bestimmung des Aminosäuregehalts nach der Formolmethode.

Von

Dr. L. de Jager zu Stiens (Niederland).

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1910.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ habe ich gezeigt, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aminosäure und Ammoniak die Titrierung mittels der Formolmethode einen niedrigeren Wert ergibt, als die Summe der Aciditätszunahmen entspricht, wenn beide für sich nach dieser Methode untersucht werden. Nach Henriques und Sörensen²⁾ soll diese Erscheinung durch die Bildung von Methylenimin verursacht werden. In einer weiteren Mitteilung³⁾ habe ich darauf hingewiesen, daß auch durch Zusatz von Hexamethylentetramin zu einer Mischung von Glykokoll und Salmiak nach Formalinzusatz eine zu geringe Aciditätszunahme gefunden wird, während Urotropin ohne Einfluß auf die beiden Körper ist, wenn dieselben gesondert untersucht werden. Neuerdings fand ich,⁴⁾ daß die für Phenolphthalein saure Reaktion einer Salmiaklösung in eine neutrale verwandelt wird, wenn Kaliumsulfat im Überschuß hinzugesetzt wird, wie es Folin⁵⁾ für Kaliumoxalat gefunden hat.

Es schien mir möglich, daß es gelingen könnte, einen Körper ausfindig zu machen, welcher einen solchen Einfluß auf die Ionisation auszuüben imstande ist, daß dadurch die gegenseitige Einwirkung der durch Formaldehyd aus Ammoniak und Aminosäuren gebildeten Körper aufgehoben wird. Kaliumsulfat und Kaliumoxalat erwiesen sich als wirkungslos sowohl auf Lösungen von Salmiak oder Glykokoll als auf eine Mischung dieser beiden Körper.

Anders erwies sich der Einfluß des Harnstoffs. Nach Malfatti⁶⁾ soll Harnstoff von Formaldehyd nicht beeinflusst werden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXII.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIV.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXV.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 1.

⁵⁾ Americ. Journal of Physiology, Bd. IX, Nr. V.

⁶⁾ Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. XLVII.

Ich habe früher diese Angabe bestätigen können. Dasselbe gilt aber nur für geringe Mengen Harnstoff. Eine Lösung von 600 mg Harnstoff in 30 ccm Wasser, also in einer Menge, wie dieser Körper im Harn anwesend ist, zeigte nach Formalinzusatz eine Aciditätszunahme, entsprechend 0,4 ccm $n/10$ -NaOH.

Ich versetzte Lösungen von Glykokoll, von Salmiak und Mischungen beider Verbindungen mit 600 mg Harnstoff und führte sodann die Formoltitrierung aus. Der Erfolg ist folgender:

	Verbrauchte $n/10$ -Natronlauge	
		nach Zusatz von 600 mg Harnstoff
50 mg Salmiak	9,6	10,1
60 » Glykokoll	8,2	8,6
Mischung	16,1	17,8

Es muß von den Zahlen in dem letzten Stab 0,4 abgezogen werden, weil Harnstoff für sich diese Aciditätszunahme gibt. Die Mischung von Salmiak und Glykokoll zeigt jetzt eine Aciditätszunahme von $17,8 - 0,4 = 17,4$ ccm $n/10$ -NaOH, also fast dieselbe wie beide Körper zusammen: $9,6 + 8,2 = 17,8$.

Ich wiederholte diesen Versuch mit wechselnder Menge Harnstoff. In jedem Versuch sind 50 mg NH_4Cl und 30 mg Glykokoll anwesend. Die Harnstoffacidität ist in Abzug gebracht.

Summe der beiden Bestimmungen	13,60 ccm
Ohne Zusatz	12,50 »
Mit 100 mg Harnstoff	12,63 »
» 200 »	12,76 »
» 300 »	12,90 »
» 400 »	13,03 »
» 600 »	13,30 »

Mit einer größeren Menge Harnstoff blieb die Aciditätszunahme dieselbe; wie mir schien, wurde dieser Wert selbst etwas kleiner.

Durch Zusatz von Harnstoff wird also die gegenseitige Einwirkung der beiden Umwandlungsprodukte aufgehoben. Nachheriger Zusatz von Harnstoff ist ohne Einfluß.

Auf die gesonderten Bestimmungen ist der Harnstoff ohne Einfluß.

Es wäre nun immerhin möglich, daß der Harnstoff nicht auf die gegenseitige Einwirkung von Salmiak und Glykokoll Einfluß übt, sondern daß die Zunahme zufällig mit der theoretischen Aciditätszunahme von Glykokoll und Salmiak stimmt. Zur Untersuchung dieser Frage stellte ich folgende Versuche an. Ich titrierte Lösungen von Glykokoll und Salmiak, setzte danach die andere Verbindung hinzu und titrierte weiter. Dann wiederholte ich diesen Versuch, setzte aber zu jeder Probe 600 mg Harnstoff hinzu. In einer dritten Versuchsreihe setzte ich den Harnstoff nach der ersten Titrierung hinzu. Jede Probe wird auf 30 ccm angefüllt. Ich erhielt (in den Versuchen mit Harnstoff nach Abzug von 0,4 ccm) folgende Zahlen:

Es verbrauchten nach Formolzusatz:

Glykokollösung	3,8 ccm	$\frac{n}{10}$ -Natronlauge
Salmiaklösung	8,9	»
Summe beider Bestimmungen	12,7	»
Mischung beider Lösungen	11,2	»
Mischung mit 600 mg Harnstoff	12,4	»

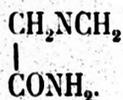
In der folgenden Tabelle ist im ersten Stab die nach Formolzusatz erforderliche Menge $\frac{n}{10}$ -Natronlauge angegeben. Im zweiten Stab ist die Menge $\frac{n}{10}$ -Natronlauge angegeben, welche im ganzen verbraucht wurde, nachdem zu der im ersten Stab angegebenen Lösung der im zweiten Stab angegebene Zusatz hinzugegeben war.

Verbrauchte $\frac{n}{10}$ -Natronlauge

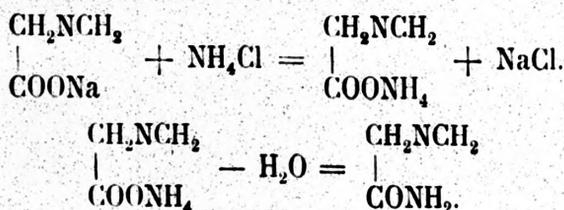
bei der ersten Bestimmung		im ganzen nach Zusatz von	
Glykokoll	3,8	Salmiak	11,1
Salmiak	8,9	Glykokoll	11,9
Glykokoll + Harnstoff	3,9	Salmiak	12,8
Salmiak + Harnstoff	9,0	Glykokoll	12,7
Glykokoll	3,8	Salmiak + Harnstoff	12,7
Salmiak	8,9	Glykokoll + Harnstoff	12,7

Hieraus ergibt sich folgendes: Durch den Zusatz von Harnstoff zu einer Mischung wird fast die Summe beider Bestimmungen erreicht. Wenn entweder Salmiak oder Glykokoll für sich titriert wird, so wird nach Zusatz des anderen Körpers der richtige Wert gefunden, sofern Harnstoff anwesend ist, mag dieser vor oder nach der ersten Titrierung zugesetzt sein.

Welche Wirkung wird nun vom Harnstoff ausgeübt? Aus obigen Versuchen geht folgendes hervor: Das Umwandlungsprodukt des Glykokolls zeigt eine für Phenolphthalein saure Reaktion und erheischt zur Neutralisierung eine dem Stickstoffgehalt äquivalente Menge Lauge. Dieser Körper $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ oder nach Sättigung $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COONa}$ ist imstande, bei Anwesenheit von Verbindungen, welche NH_2 enthalten, überzugehen in die Verbindung



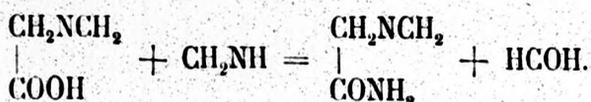
Bei Anwesenheit von Salmiak könnte vielleicht folgende Umsetzung stattfinden



Vielleicht entsteht die letztere Verbindung sogleich unter Austritt von Wasser.

Wenn obige Umsetzung stattfindet, verschwindet ein Teil des Salmiaks. Dieser Anteil gibt bei Formalinzusatz keine Aciditätserhöhung.

Auch an den unter Einfluß des Formaldehyds aus dem Salmiak entstandenen Verbindungen wird NH_2 gegen OH oder ONa ausgetauscht. Wenn, wie Henriques und Sörensen¹⁾ annehmen, sich Methyleneimin bilde, so konnte etwa folgende Reaktion stattfinden



Auch in diesem Fall hat die saure Reaktion abgenommen.

Geringer, aber noch deutlich wahrnehmbar ist die Einwirkung des Hexamethylentetramins. Wenn in dieser Verbindung $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, welche auch $(\text{CH}_2)_2(\text{NH}_2)_4\text{C}_4$ geschrieben werden kann, ein oder mehrere NH_2 gegen OH ausgetauscht werden, so entsteht ebenso wenig eine saure Verbindung.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIV.

Es hat nun den Anschein, daß das NH_2 am leichtesten den Ammoniakverbindungen entnommen wird und daß diese Umsetzung um so schwerer zustande kommt, je weiter die Bildung von Hexamethylentetramin fortgeschritten ist, wie auch Henriques und Sörensen gezeigt haben.

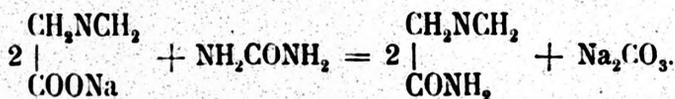
Setzt man zu einer nach Formolzusatz neutralisierten Lösung von Glykokoll, welche also $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COONa}$ enthält, Salmiak hinzu, so würde eine dem Gehalt an Glykokoll entsprechende Menge Salmiak keine Aciditätserhöhung zeigen, wenn kein überschüssiges Formol zugegen wäre. Durch die Anwesenheit des Formols wird aber zugleich ein Teil des Salmiaks dieser Wirkung entzogen.

Wird hingegen der Salmiak zuerst mit Formol behandelt und neutralisiert, so wird der Einfluß des jetzt gebildeten Körpers weniger groß sein, weil diese Verbindung nicht so leicht NH_2 gegen OH auswechself.

Ich habe zwei Versuche in dieser Richtung angestellt. Eine Lösung von Glykokoll, welche bei der Formoltitrierung zur Neutralisation 3,9 ccm n_{10} -NaOH erforderte, wurde neutralisiert, darauf wurde Ammoniak in Überschuß hinzugefügt und nach einiger Zeit neutralisiert. Es ergab sich, daß die Verbindung $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ auf nachträglich zugesetztes Salmiak keine Einwirkung mehr ausübte. Das überschüssige Formol wird durch das NH_3 zu $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ und es muß nach Salmiakzusatz aufs neue Formalin hinzugesetzt werden. Die Aciditätszunahme war jetzt ebenso groß wie die der Salmiaklösung für sich, nämlich 9,2 ccm n_{10} -NaOH. Der Austausch der OH -Gruppe gegen NH_2 war also ein vollständiger gewesen.

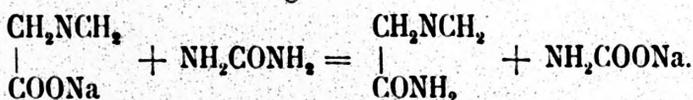
In einem zweiten Versuch wurde die mit Formol behandelte neutralisierte Glykokollösung während einiger Zeit erhitzt, um den überschüssigen Formaldehyd auszutreiben, was nur zum Teil gelang. Es hatten sich aber andere Umsetzungen vollzogen, denn die Reaktion war eine saure geworden.

Setzt man nun zu einer mit Formol behandelten und neutralisierten Glykokollösung Harnstoff hinzu, so wird diesem Körper NH_2 entnommen. Es bestehen zwei Möglichkeiten. Entweder es verliert der Harnstoff 2 NH_2 nach folgender Gleichung

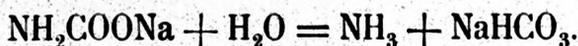


Dieses ist nicht der Fall, denn dann würde die Acidität abgenommen haben und zwar, wenn diese Umsetzung vollständig wäre, genau um die Hälfte.

Es kann aber auch nur ein NH_2 in Anspruch genommen werden nach der Gleichung



In diesem Fall entsteht Natriumcarbaminat, welches aber sofort zerfällt zu Ammoniak und Carbonat unter Aufnahme von Wasser



Das NH_3 wird unter dem Einfluß des Formols zu Hexamethylentetramin, während das Natriumhydrocarbonat Phenolphthalein gegenüber dieselbe Reaktion zeigt wie das $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COONa}$. Daß diese Umsetzung stattfindet, habe ich folgendermaßen bewiesen. Eine Mischung von Harnstoff und Glykokoll wird mit Formalin versetzt und mit Baryumhydrat neutralisiert. Anfangs bleibt die Lösung klar, nach und nach aber trübt sie sich und es scheidet sich Baryumcarbonat aus, welches unter Aufbrausen in Salzsäure gelöst werden kann.

Ich habe angenommen, daß das NH_2 auch dem Salmiak entnommen werden kann. Dieses braucht aber nicht der Fall zu sein. Es wird durch Zusatz von NaOH das Salmiak zersetzt und es wird NH_3 abgespalten, das sich jetzt sofort unter Abspaltung des NaO mit dem aus dem Glykokoll hervorgegangenen Körper verbinden kann.

Ich habe früher¹⁾ darauf hingewiesen, daß Salmiak nicht ohne Mithilfe von Natronlauge von Formol zersetzt wird.

Wenn zu einer Lösung von Salmiak wenig Formalin und nach einiger Zeit Harnstoff und Salzsäure zugesetzt wird, so entsteht ein Niederschlag von Formolharnstoff, selbst in einer gesättigten Lösung von Salmiak oder Ammoniumsulfat. Daraus geht hervor, daß der Formaldehyd nicht imstande ist, Ammoniumchlorid zu zersetzen, sondern auch dazu die Anwesenheit

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIV, Heft 2, S. 114.

von Lauge erforderlich ist.¹⁾ Durch sie wird NH_3 abgespalten, welches sich darauf mit Formaldehyd verbindet. Nun ist es mir doch wahrscheinlicher, daß dieses NH_3 sich sofort mit dem $\text{R} \cdot \text{NCH}_2\text{COOH}$ verbindet, als daß es erst Methylenimin bilden, und daß diese Verbindung nachher wieder zersetzt werden soll. Wenn die Glykokollösung zuerst mit Formol behandelt und neutralisiert wird, so gibt der nachherige Zusatz von Salmiak dieselbe Aciditätserhöhung, als wenn beide Körper von Anfang an anwesend wären. Es findet in diesem Fall die Verbindung $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ sofort NH_3 vor. Ist aber das Salmiak für sich vorbehandelt, so ist nur neben Hexamethylentetramin Methylenimin anwesend und es ist nicht einzusehen, wie der sehr große Unterschied dem vorigen Versuch gegenüber zu erklären ist.

Die Einwirkung des Formaldehyds auf Glykokoll findet statt ohne Mithilfe von Natronlauge. Eine Glykokollösung, welche nach Formalinzusatz einen Verbrauch von 5,1 ccm n_{10} -NaOH erforderte, wurde versetzt mit 0,5 g Formalin. Nach 10 Minuten wurden 400 mg Harnstoff und 1 ccm Salzsäure von 38% hinzugesetzt. Nach einer Stunde wurde die Salzsäure neutralisiert, wieder Formalin zugegeben und titriert. Es war jetzt nur 0,4 ccm n_{10} -NaOH zur Neutralisation erforderlich. Wenn der Harnstoff sofort zugesetzt und bald angesäuert wurde, so betrug der Verbrauch 1,5 ccm n_{10} -NaOH. Es hat im letzteren Versuch der Harnstoff zwar einen Teil des Formaldehyds in Beschlag genommen, aber doch ist mehr als die Hälfte des Glykokolls umgesetzt. Je später die Lösung angesäuert wird, um so größer ist die nachträgliche Aciditätszunahme; diese betrug, wenn Salzsäure zugesetzt wurde, nach 10 Minuten 2,3 ccm, nach 30 Minuten 2,9 ccm n_{10} -NaOH. Das Formaldehyd verbindet sich also sofort mit dem Glykokoll. Wenn Harnstoff anwesend ist, kann demselben NH_2 entnommen werden, nicht aber dem Formolharnstoff, welcher sich ohne Einfluß erwies. Es hat nun den Anschein, als ob das nicht neutralisierte $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ denselben Austausch mit dem Harnstoff eingeht, aber langsamer als nach Alkalizusatz.

¹⁾ Weitere Versuche ergaben, daß durch Salzsäure Hexamethylentetramin zersetzt wird unter Abspaltung von Formaldehyd.

Setzt man sofort Salzsäure hinzu, so hat, nachdem sich Formolharnstoff gebildet hat, nachheriger Zusatz von Formalin keinen Einfluß auf die Reaktion.

Nach und nach bildet sich carbaminsaures Natrium. Bei sofortigem Zusatz von Natronlauge ist dieses, wie oben gezeigt ist, ohne Einfluß. Anders aber, wenn Salzsäure hinzugesetzt wird. In diesem Fall wird das gebildete Ammoniak nicht zu Hexamethylentetramin, sondern es wird durch HCl abgesättigt. Nachdem der Formaldehyd sich mit dem Harnstoff zu Formolharnstoff verbunden hat, enthält jetzt die Lösung Salmiak, welches bei der Formoltitrierung eine Aciditätserhöhung verursacht. Dadurch erklärt sich, warum das Glykokoll sich vollständig mit Formaldehyd verbunden zu haben scheint, wenn Harnstoff und Salzsäure zu gleicher Zeit zugesetzt werden, während die Umsetzung unvollständig scheint, wenn die Lösung später angesäuert wird.

Das Ammoniak kann sich auch mit Formaldehyd zu Hexamethylentetramin verbinden. Doch enthält die Lösung sehr wenig Formalin, so daß dieses nicht zu geschehen braucht. Aber auch wenn diese Verbindung zustande kommt, bleibt die gegebene Erklärung richtig. Ich versetzte 20 ccm Harn mit 150 mg Urotropin und 1 ccm Salzsäure. Nach einigen Stunden war Formolharnstoff niedergeschlagen. Der Harnstoff entzieht demnach unter Mithilfe der Salzsäure dem Urotropin Formol, wodurch Ammoniak abgespalten wird, das sich nun mit Salzsäure verbindet.¹⁾

Weiter setzte ich Ammonium zu 0,5 g Formalin hinzu, bis die Farbe stark rot war. Nach 3 oder 10 Minuten wurden 20 ccm Harn und HCl hinzugefügt. Nach einigen Stunden hat sich Formolharnstoff abgesetzt. Auch hier ist die anfangs gebildete Verbindung von Ammonium und Formaldehyd in ihren Komponenten zersetzt und die Lösung enthält jetzt Salmiak.

Im Harn ist neben Ammoniakverbindungen und Aminosäuren Harnstoff anwesend. Daher wird hier die nach Formalinzusatz gefundene Aciditätszunahme wahrscheinlich die Summe

¹⁾ Nach Neutralisation gibt Formolzusatz eine starke Aciditätszunahme.

der Aciditätszunahmen geben, welche Ammoniakverbindungen und Ammosäuren jede für sich geben würden. Zwar ist diese Zahl etwas zu niedrig, aber weil der Harnstoff auch eine geringe Aciditätszunahme aufweist, kann der gefundene Wert als der richtige angenommen werden.

Lösungen von Glykokoll oder Salmiak zu Harn hinzugesetzt ergaben richtige Werte; auch wenn zuerst Glykokoll hinzugesetzt und darauf neutralisiert wurde, ergab eine Salmiaklösung die richtige Zahl. Zusatz einer Mischung beider Körper zeigte aber eine zu geringe Aciditätszunahme.

Nach Abzug der Aciditätszunahme, welche der Harn für sich ergab, fand ich folgende Werte nach Zusatz einer Glykokollösung, welche für sich 3,9 ccm, und einer Salmiaklösung, welche 9,2 ccm n_{10} -NaOH erheischen. Zu einer Mischung waren 11,5 ccm erforderlich, die Summe der beiden Aciditäten betrug 13,1 ccm n_{10} -NaOH.

Zugesetzt wurde zu 20 ccm Harn	Die Aciditätszunahme betrug in ccm n_{10} -NaOH
Glykokoll nach Titration des Harns	3,8
Salmiak » » » »	9,0
Glykokoll sofort zugesetzt	3,9
Salmiak » »	8,9
Glykokoll nach Neutralisation Salmiak . . .	13,1
Glykokoll und Salmiak nach Titration des Harns	12,5
Glykokoll und Salmiak sofort zugesetzt . . .	12,0

In einigen Versuchen wurde der Zusatz dem Harn sofort zugegeben, in anderen Fällen wurde zuerst der Harn nach Formalinzusatz neutralisiert.

Es ist in diesem Fall der Harnstoffgehalt relativ zu niedrig, sodaß, wenn beide Körper zugleich hinzugesetzt werden, das Umsetzungsprodukt des Glykokolls nur zum Teil das NH_2 dem Harnstoff entzieht, zum Teil aber dem Salmiak.

In meiner ersten Mitteilung¹⁾ habe ich in Tabelle I Zahlen mitgeteilt, aus welchen hervorgeht, daß die Aciditätszunahme,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXII.

welche der Harn nach Formalinzusatz zeigt, nicht, wie zu erwarten war, niedriger, sondern höher ist, als der Summe der gesondert bestimmten Ammoniak- und Aminosäure entspricht. Damals schien es mir, daß die von mir angegebene Methode zur Bestimmung des Ammoniaks zu hohe Zahlen gibt. Es ist mir nun deutlich geworden, daß dasselbe nicht der Fall ist, sondern daß der Harnstoff diese Differenz verursacht hat.

Die genannte Methode ist tatsächlich nicht genau, weil es nicht ganz leicht ist, den Zeitpunkt, wo alles NH_3 zu Tripelphosphat gebunden ist, genau zu bestimmen. Den absoluten Zahlen ist daher nicht viel Wert beizulegen. Es war mir aber aufgefallen, daß ich in einer späteren Versuchsperiode, während welcher ich täglich 7,5 g Calciumsulfat einnahm, regelmäßig eine geringere Aciditätszunahme des Harns nach Formalinzusatz fand, als die Summe von NH_3 und Aminosäure entsprach. Ich habe die Methode seither zur Seite gestellt. Doch ist auch dieses mir jetzt leicht erklärlich, weil an diesen Tagen der Ammoniakgehalt des Harnes stark zugenommen hatte.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß die von Henriques und Sörensen gegebene Erklärung, warum die Formolmethode bei Mischungen von Ammoniak und Aminosäuren zu niedrige Werte ergibt, die richtige ist. Nur möchte ich hinzufügen, daß wahrscheinlich nicht erst Methylenimin anwesend zu sein braucht, sondern daß NH_3 und vielleicht auch Ammoniakverbindungen denselben Einfluß haben. Auch andere Aminoverbindungen sind imstande, NH_2 gegen OH auszutauschen. Ob dadurch die Reaktion dieselbe bleibt oder eine andere wird, ist nur davon abhängig, wie die Reaktion der dadurch entstandenen Verbindung Phenolphthalein gegenüber sich erweist. Durch Zusatz von Harnstoff kann die gegenseitige Einwirkung von Ammoniakverbindungen und Aminosäuren aufgehoben werden. Wahrscheinlich gibt es noch andere Körper, welche denselben Einfluß auszuüben imstande sind.

Das praktische Ergebnis ist, daß die Methode, beim Harn angewandt, fast richtige Werte gibt.
