

Über die Isolierung von Leucin und anderen Aminosäuren aus Körperflüssigkeiten.

Von

Priv.-Doz. Dr. F. Lippich.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute der Prager deutschen Universität.)
(Der Redaktion zugegangen am 20. Februar 1914.)

Trotz einer Reihe von Methoden und trotz einer reichen Literatur über den Gegenstand gehört die Isolierung von Aminosäuren aus Körperflüssigkeiten und deren sichere Identifizierung noch keineswegs zu den leichten Aufgaben. Ja selbst der Nachweis des Tyrosins ist nicht immer ganz einfach zu führen. Denn ganz abgesehen von der Empfindlichkeit, die bei jenen Methoden nur gering sein kann, muß zur sicheren Identifizierung die Aminosäure aus dem Derivat, in welches sie zur Isolierung übergeführt wurde, wieder regeneriert und dann meist ihrerseits noch weiteren Reinigungsprozeduren unterworfen werden. Dies gilt auch für den Fall, den ich hier im Auge habe, daß nur eine oder zwei Aminosäuren zugegen sind. Nun besitzen wir in den Uramidosäurereaktionen ein Mittel, die Aminosäuren in Derivate überzuführen, deren Molekül nur wenig größer ist, als jenes der Ausgangskörper, was für die Elementaranalyse von Bedeutung ist, und die ferner meist so ausgesprochene analytische Eigenschaften aufweisen, daß zur sicheren Identifizierung die Aminosäure gar nicht regeneriert zu werden braucht, d. h. daß also mit der Charakterisierung jenes Derivates auch die zugehörige Aminosäure eindeutig bestimmt ist. Es mag bei dieser Gelegenheit neuerdings hervorgehoben werden, daß schon das Zustandekommen der Uramidosäurebildung unter den von mir angegebenen Bedingungen für sich allein so charakteristisch ist, daß, wenigstens soweit physiologische Verhältnisse in Frage

kommen, der positive Ausfall der Reaktion allein das Vorhandensein der einen oder anderen Aminosäure mit einer Sicherheit anzeigt, die hinter jener, von allgemein verwendeten Reaktionen auf andere physiologische Substanzen, nicht zurücksteht.

In der vorhergehenden Abhandlung wurde gezeigt, daß dies besonders für den Nachweis von Leucin gilt, jedoch wurde dort vorausgesetzt, daß das Leucin wenigstens bis zu einem gewissen Grade isoliert vorliegt. Für Körperflüssigkeiten ist es nun wichtig zu entscheiden, ob und wieweit die Reaktion ohne vorhergehende Isolierung der Aminosäure (von der selbstverständlichen Entfernung von Eiweiß usw. abgesehen) verwendbar ist, weil es ja doch hauptsächlich darauf ankommt, die Empfindlichkeit des Nachweises möglichst zu steigern. Gelingt einmal der Nachweis möglichst kleiner Mengen, dann ergibt sich die Isolierung größerer Mengen und bei der leichten Reindarstellung speziell der Leucinursäure die Identifizierung der Aminosäure ohne Schwierigkeit. Von diesem Gesichtspunkte aus wurden die zunächst mitzuteilenden Versuche unternommen. In erster Linie war natürlich der Harn zu berücksichtigen. Handelt es sich um sehr kleine Aminosäuremengen, so ist — von pathologischen Substanzen sei inzwischen abgesehen — zunächst an den im Verhältnis zur Aminosäure enormen Harnstoffüberschuß zu denken. Es möchte wohl scheinen, daß es vorteilhafter wäre, durch einfaches Kochen des Harns die Überführung in die Uramidosäure herbeizuführen. Da es sich aber um den Nachweis von Leucin dreht, für welches speziell die Abscheidung der freien Uraminosäure charakteristisch und am empfindlichsten ist, so muß man trachten, letztere resp. ihr Salz in möglichst konzentrierter Lösung, welche tunlichst geringe Mengen besonders von krystallisationshemmenden Substanzen führt, zu erhalten. Nun ist, wie ich schon mitgeteilt habe, gerade ein großer Harnstoffüberschuß geeignet, die Krystallisation der Uramidosäure stark zu hemmen. Selbst bei vielstündigem Kochen des Harnes würde nur ein kleiner Teil des vorhandenen Harnstoffes zerstört werden. Andererseits war bei Versuchen, den

Harnstoffüberschuß zu entfernen, ein Verlust an Aminosäure zu befürchten, was, da es sich ja um den Nachweis kleiner Mengen handeln sollte, nicht übersehen werden durfte. Es erschien also am zweckmäßigsten, die Aminosäure gleichzeitig mit dem Harnstoff herauszuholen und dann erst die erstere von dem letzteren zu trennen. Hierzu wurde ein sehr elegantes Verfahren verwendet, welches hier mitgeteilt sei, weil es vielleicht anderweitig gute Dienste leisten kann. 5 mg Leucin und 3 g Harnstoff wurden in einem mit eingeriebenem Rückflußkühler versehenen Kölbchen mit einem Überschuß von Amylalkohol durch 12 Stunden gekocht. Dabei wird der Harnstoff quantitativ in Amylurethan übergeführt, welches leicht durch Äther entfernt werden kann; wird durch das Kochen mit Amylalkohol die Aminosäure nicht alteriert, so muß sie nach Entfernung des Urethans wiedergefunden werden. In der Tat wurde nach Abdampfen des überschüssigen Amylalkohols am Wasserbade und nach Entfernung des Urethans mit Äther ein Rückstand erhalten, der in jener, in der vorhergehenden Abhandlung beschriebenen Weise auf Leucin geprüft, einen positiven Ausfall der Reaktion gab. Auf den Harn wurde die Reaktion in der Weise angewendet, daß der im Vakuum gewonnene Abdampfrückstand von 100—200 ccm eines Harnes mit 0,005 % Leucin, mit ammoniakalischem Alkohol extrahiert wurde in der Voraussetzung, hierdurch gleichzeitig auch das Leucin zu gewinnen. Der Rückstand vom ammoniakalischen Alkohol wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und sodann in der oben angegebenen Weise mit überschüssigem Amylalkohol gekocht. Leider wurde trotz mehrfacher Wiederholung mit jedesmaligen Modifikationen, schließlich ein positives Resultat nicht erhalten, vermutlich infolge der braunen harzigen Substanzen, die beim Kochen der Harnextrakte mit Amylalkohol sich bilden.

Dieser Versuch, durch möglichste Isolierung des Leucins zum Ziele zu gelangen, war somit zunächst fehlgeschlagen. Es wurde daher nunmehr getrachtet, den Nachweis direkt, ohne vorhergehende Isolierung zu führen. Es war dabei von vornherein klar, daß dies nur mit einer gewissen Einbuße an

Empfindlichkeit gelingen konnte. Nach einer Reihe von Vorversuchen erwies sich das folgende einfache Verfahren am zweckmäßigsten: 100 ccm Leucin-harn werden in einem nicht zu kleinen offenen Kolben über freier Flamme eingekocht (auf etwa $\frac{1}{3}$ Vol.); hierauf wird etwa das gleiche Volum kalt gesättigten Barytwassers zugefügt und die Flüssigkeit 3—4 Stunden im Sieden erhalten. Nimmt während des Kochens die Ammoniakentwicklung ab, so muß, falls der Ersatz der weggekochten Flüssigkeit durch Barytwasser dieselbe nicht wieder steigert, etwas Harnstoff zugefügt werden. In die heiße Flüssigkeit wird sofort Kohlensäure eingeleitet, und das Filtrat vom kohlen-sauren Baryt mit etwas Tierkohle unter Kochen entfärbt; hierauf dampft man am Wasserbade ein, wobei sich die Flüssigkeit meist wieder etwas gelb färbt, filtriert, wenn nötig, die auf wenige Kubikzentimeter (3—4) eingeeengte Flüssigkeit, oder die Lösung des mit möglichst wenig Wasser aufgenommenen Rückstandes durch ein kleines Filterchen in eine Eprouvette und säuert nun vorsichtig mit Salzsäure an; entsteht der Niederschlag, d. h. die charakteristische Ausscheidung von nadelförmigen Krystallen nicht alsbald, so impft man und schüttelt häufig und anhaltend; die Reaktion ist erst dann als negativ zu betrachten, wenn auch nach häufigem Schütteln und 12 stündigem Stehen keine Krystallisation erfolgt ist; unter Umständen werden nach dieser Zeit besonders schöne Krystalle erhalten. Die Krystalle sind wenig gefärbt; undeutliche und dann meist gefärbte krystallinische Ausscheidungen sind nicht beweisend.

Die kleinste auf diesem Wege noch nachweisbare Menge zugesetzten Leucins beträgt 0,01 g in 100 ccm Harn; doch muß in diesem Falle die Reaktion mit einer gewissen Übung und Erfahrung resp. Vorsicht ausgeführt werden; unter allen Umständen gelingt die Reaktion und zwar fast immer mit unzweifelhaftem, starkem Ausfall, bei einem Gehalt des Harnes von 0,015—0,02 g Leucin auf 100 ccm. Wie man sieht, erweist sich zum Nachweise des Leucins in Form der freien Uramido-säure die Verwendung von Barytwasser am vorteilhaftesten. Durch das mehrstündige Kochen mit demselben wird ein er-

heblicher Teil des überflüssigen und später störenden Harnstoffes zersetzt; doch ist zu beachten, daß immer ein gewisser Harnstoffüberschuß vorhanden sein muß, damit nicht schon gebildete Uramidosäure wieder zerlegt wird. Auch im Sinne der Entfernung anderer Harnbestandteile, wie eines Teiles der färbenden Substanzen, der Zerlegung gewisser normalerweise vorhandener Körper, wie der Hippursäure usw., ist das Barytwasser zweckmäßig. Wird durch dasselbe auch eine Herabsetzung der Empfindlichkeit bedingt, so ist diese im Vergleich zu der im Harn ohne vorherige Isolierung des Leucins voraussichtlich überhaupt zu erreichende Empfindlichkeit gewiß nicht sehr groß und fällt schon garnicht ins Gewicht, wenn man diese Reaktion mit den für den Nachweis von Leucin im Harn verfügbaren Methoden vergleicht. Die Überlegenheit auch in anderer Beziehung der hier mitgeteilten Methode kennzeichnet sich wohl am besten durch den Hinweis, daß hier eine Reaktion vorliegt, die kleine Mengen eines Körpers, der sonst nur bei größeren Quantitäten und auch da nur schwierig nachzuweisen ist, mit einer Einfachheit und Sicherheit nachzuweisen gestattet, die an jene des Harnstoff- oder Harnsäurenachweises heranreicht. Die normalerweise vorkommenden Harnbestandteile können wohl zu ernstlichen Verwechslungen keine Veranlassung geben, wenigstens was den Fleischfresserharn anlangt; aber auch in pathologischen Harnen sind bei entsprechender Vorsicht Verwechslungen kaum möglich, zum mindesten wird schon eine Behandlung der erhaltenen Krystallisation mit Äther, vorausgesetzt, daß es sich um gut ausgebildete Krystalle handelt (vgl. das bei Beschreibung der Reaktion Gesagte), in den allermeisten Fällen vor Verwechslungen schützen. Es würde zu weit führen, hier auf alle Möglichkeiten des genaueren einzugehen, es dürfte wohl die Tatsache genügen, daß im normalen Menschenharn wenigstens die Reaktion ohne Zusatz von Leucin niemals positiv ausfällt, auch nicht andeutungsweise. Es erledigt sich damit auch der eventuelle Einwand, daß durch das Kochen mit Barytwasser Leucin aus eiweißartigen Harnbestandteilen abgespalten werden könnte. Aber auch in einer ganzen Reihe pathologischer Harne, die ich untersuchte, gelang es mir niemals,

eine positive Reaktion zu erhalten. Es befanden sich darunter Harnen nach Phosphorvergiftungen in verschiedenen Stadien des Verlaufes, Harnen von Leukämischen, von Pneumoniefällen im Stadium der Lysis, von Tuberkulösen, ikterische Harnen, Harnen bei Neubildungen usw. Wurde solchen pathologischen Harnen auf 100 ccm 0,02 g Leucin zugesetzt, so fiel die Reaktion positiv aus.

Können die normalen Harnbestandteile auch keinen Anlaß zu Verwechslungen abgeben, so ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß sie in anderer Art die Reaktion stören, indem sie insbesondere, soweit sie NH_2 -Gruppen tragen, mit Leucin reagieren. Daß dies bei Zimmertemperatur nicht der Fall ist, zeigt der Umstand, daß konservierte, über ein Jahr alte künstliche Leucin-harnen die Reaktion in derselben Weise gaben wie eben frisch bereitete. Aber auch bei Siedehitze und besonders bei Gegenwart von Barytwasser ist für den Harn speziell eine Wirkung in der angedeuteten Richtung wenig wahrscheinlich, weil jene Substanzen gegenüber dem so leicht reagierenden Harnstoff in ganz untergeordneter Menge vorhanden sind und weil sie außerdem durch kochendes Alkali leicht zersetzt werden. Nichtsdestoweniger wurde eine Reihe von Versuchen in dem genannten Sinne ausgeführt. Leucin wurde mit je der doppelten Gewichtsmenge von Hippursäure, Kreatinin, Harnsäure und Allantoin in Barytwasser gekocht. Nach ca. 6 Stunden wurde der Versuch unterbrochen und die vom überschüssigen Baryt durch Kohlensäure befreite Flüssigkeit im Vakuum verdunstet. Wie zu erwarten, ließ sich in den ersten drei Fällen eine im merklichen Maße eingetretene Reaktion nicht nachweisen, nur das Allantoin schien in irgend einer Form eingewirkt zu haben, doch ließ die geringe Menge des vermeintlichen Reaktionsproduktes weitere Schlüsse nicht zu. Da Allantoin für den Menschenharn nicht in Betracht kommt, so wurden diese Untersuchungen zunächst auf einen gelegeneren Zeitpunkt verschoben. Um Leucinursäure, die infolge des bei der alkalischen Spaltung des Allantoins entstehenden Harnstoffes gebildet worden sein konnte, handelte es sich nicht.

Was die Störung der Reaktion durch pathologische Sub-

stanzen wie Eiweiß. Zucker usw. anlangt, so seien folgende Erfahrungen mitgeteilt. Was das Eiweiß betrifft, so brauchte dasselbe kaum besonders angeführt zu werden, weil man es auf jeden Fall vor Anstellung der Reaktion durch Koagulation entfernen wird. Doch da der Harn unter Umständen nicht hitzecoagulable Eiweißkörper in größerer Menge enthalten kann, so schien es nicht nutzlos, auch den Einfluß von gegenwärtigem Eiweiß zu prüfen. Von einem Harn, welcher 0,02% Leucin und 0,2% Eiweiß enthielt, wurden 100 ccm in der üblichen Weise mit Barytwasser, diesmal unter Zufügung von etwas Harnstoff, gekocht; der im Momente des Aufkochens entstehende flockige Niederschlag wurde zunächst nicht abfiltriert; die Weiterbehandlung der Proben in der beschriebenen Weise gab negative Resultate, ob die Kochdauer mit Barytwasser 4, 6 oder 8 Stunden betrug. Wurde der im Momente des Aufkochens entstehende Niederschlag abfiltriert und sodann das Kochen fortgesetzt, so wurde eine normale positive Reaktion erhalten. Nebenbei zeigen die Versuche, daß bei der angewendeten Kochdauer Leucin in irgend erheblicher Menge durch das Barytwasser nicht abgespalten wird, wengleich das Eiweiß gewiß eine Hemmung der Reaktion vermutlich in bezug auf die Krystallisation setzt. Wurde dem gleichen Leucinharn auf 100 ccm 0,2 g Witte-Pepton zugesetzt, so wurde nach 6stündiger Kochdauer unter sonst gleichen Verhältnissen eine negative Reaktion erhalten; dagegen fiel die Reaktion in normaler Weise positiv aus, wenn der Gehalt an Pepton 0,05 g in 100 ccm Harn betrug. Desgleichen wirken größere Mengen Traubenzucker, offenbar auch durch Verhinderung der Krystallisation hemmend; die Reaktion fiel negativ aus, wenn dem Leucinharn auf 100 ccm 5—1 g Traubenzucker zugesetzt wurden, wohl aber trat eine, wenn auch langsam entstehende Krystallisation auf, wenn der Gehalt an Traubenzucker 0,5% betrug. Gallensäuren in einer Menge, wie sie im Harn wohl kaum möglich ist, hindern die Reaktion infolge der harzigen Ausscheidung der Cholsäure, welche beim Ansäuern mit Salzsäure entsteht; dagegen tritt die Reaktion bei einem Gehalt von 0,05 g Cholsäure in 100 ccm in normaler Weise positiv ein.

Der Vollständigkeit halber sei endlich noch der Möglichkeit gedacht, daß im Harn statt Leucin noch andere Amidosäuren auftreten können. Von diesen könnten Phenylalanin und eventuell noch Valin eine positive Reaktion vortäuschen. Gegen eine eventuelle Verwechslung mit Phenylalanin kann man sich wohl dadurch schützen, daß man die erhaltene Krystallisation, wenn sie nicht allzu spärlich ist, abfiltriert, und in bekannter Weise mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure prüft; auch die Uramidosäure gibt den Geruch nach Phenylacetaldehyd. Im allgemeinen müßte man jedoch trachten, durch Verarbeitung einer größeren Menge Harn genügendes Material zu einer Schmelzpunktsbestimmung usw. zu gewinnen. Für Leucin würde, besonders wenn der Prozentgehalt höher ist als der bisher angenommene, die hier mitgeteilte Methode sehr rasch und einfach zum Ziele führen, zur Isolierung anderer Aminosäuren aber würde sie wenig zweckdienlich sein; hier ist nun mit größtem Vorteile die Anhydridmethode zu verwenden.

Mittels derselben können, so weit die Erfahrungen reichen, Alanin, Valin, Leucin (natürlich auch falls sie vorkommen würde, Aminobuttersäure), ferner Phenylalanin und Tyrosin, in Form ihrer Hydantoine isoliert und nachgewiesen werden.

Die Ausführung ist wieder eine sehr einfache. Die Überführung in die Uramidosäure wird entweder durch Kochen mit Barytwasser oder durch Kochen des Harns ohne Zusatz bewerkstelligt; im ersteren Falle hat man den Vorteil der rascheren und vollständigeren Überführung und der Zerstörung eines Teiles des überschüssigen Harnstoffes, jedoch die Gefahr des Verlustes an Uramidosäure bei zu langem Kochen. Im zweiten Falle dauert die Überführung länger und ist weniger vollständig, doch ist die Gefahr eines Verlustes an einmal gebildeter Uramidosäure sehr viel geringer und es fallen, da kein Baryt vorhanden ist, Filtrationen weg. 100 ccm oder nach Belieben ein größeres Volum Harn (wobei man die Zunahme der Harnstoffmenge berücksichtigen muß) werden am Wasserbade stark eingeengt; je nachdem nun der eine oder der andere Modus der Überführung in die Uramidosäure gewählt wird, ist etwa wie folgt vorzugehen.

Der Abdampfrückstand wird mit nicht zu viel (es hängt dies natürlich von der Harnmenge ab) Barytwasser aufgenommen und mehrere Stunden unter Beachtung der schon angegebenen Umstände gekocht; will man mit Salzsäure anhydrieren, so fällt man den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure aus; bei Anhydrierung mit Schwefelsäure kann man direkt mit dieser ansäuern, nur muß dabei bedacht werden, daß ein gleichzeitiges Ausfallen von Uramidosäure mit dem schwefelsauren Baryt kaum zu bemerken ist.

Will man ohne Verwendung von Barytwasser vorgehen, so wird der Abdampfrückstand mit wenig Wasser aufgenommen und im offenen Kolben stundenlang gekocht; meist ist es notwendig, nach einiger Zeit infolge starken Stoßens, welches durch einen ausfallenden Niederschlag bedingt ist, zu filtrieren. Da das Kochen bei kleinem Volum im offenen Kolben ständige Überwachung erfordert, so ist es zweckmäßig, das Kochen am Rückflußkühler vorzunehmen, jedoch so, daß man zur Wegführung des sich bildenden Ammoniaks einen Wasserstoffstrom durch die kochende Flüssigkeit leitet. Nach Unterbrechung des Kochens kann sich sofort die Anhydrierung anschließen. Bezüglich derselben sei auf das in der vorhergehenden Abhandlung Gesagte verwiesen. Da das lange Kochen mit Säuren im Harn starke Färbungen hervorruft, so entfärbt man zweckmäßig vor der Ätherextraktion mit Tierkohle in der Siedehitze, wobei man einen nach der Anhydrierung eventuell ausgefallenen Niederschlag vorher abfiltriert. Die Gewinnung des Anhydrids mit Äther wird durch wiederholte Ausschüttelungen oder mit Hilfe eines Extraktionsapparates von kleineren Dimensionen (50—100 ccm Fassungsraum) bewerkstelligt.

Folgende Beispiele mögen das Gesagte illustrieren. Zu 100 ccm Harn wurden 0,1 g Tyrosin gesetzt und auf dem Wasserbade auf ein kleines Volum eingengt. Hierauf wurde mit Barytwasser verdünnt, die Flüssigkeit in einen kleinen Kolben übertragen, noch etwas Harnstoff zugesetzt und 2 Stunden im Sieden erhalten. Hierauf wurde der Baryt mit Kohlensäure entfernt, das Filtrat mit Salzsäure stark angesäuert und am Wasserbade eingedampft. Nach dem Verdünnen und Entfärben

mit Tierkohle wurde viermal mit immer neuen Portionen Äther ausgeschüttelt; nach Abdestillieren des Äthers hinterblieb ein gelblich gefärbter Rückstand, der starke Millonsche Reaktion gab. Er wurde aus kochendem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert; beim Erkalten schieden sich schöne, weiße, nadelförmige Krystalle ab; diese zeigten alle Eigenschaften des Tyrosinurids (Hydantoin der β -p-Oxyphenyl- α -uramido-propionsäure); ihr Schmelzpunkt im geschlossenen Kapillarrohr lag bei 245—247°. Ganz ähnlich verlief ein anderer Versuch, bei dem unter sonst gleichen Verhältnissen der tyrosinhaltige Harn für sich ohne Zusatz von Barytwasser gekocht wurde; anhydriert wurde mit Schwefelsäure. 100 ccm Harn mit 0,2 g Tyrosin und 0,1 g Leucin wurden wie vorher am Wasserbade stark eingengt, der Rückstand mit Barytwasser aufgenommen und nach Zusatz von etwas Harnstoff 3 Stunden gekocht. Nach Entfernung des Baryts mit Kohlensäure wurde durch zweistündiges Kochen mit Salzsäure anhydriert, mit Tierkohle entfärbt, die Tierkohle einmal ausgekocht, die vereinigten Filtrate etwas eingengt und sechsmal mit Äther ausgeschüttelt. Schon vor dem Ausschütteln hatten sich aus der salzsauren Flüssigkeit Krystallnadeln ausgeschieden, die abfiltriert worden waren; sie gaben starke Tyrosinreaktion. Der nach Abdestillieren des Äthers verbliebene Rückstand wurde zunächst mit Chloroform behandelt, wobei ein Teil in Lösung ging. Der nicht lösliche Anteil war fast weiß; er zeigte die Eigenschaften des Tyrosinurids; sein Schmelzpunkt lag trotz des Nichtumkrystallisierens ganz nahe dem angegebenen von 245°, doch erfolgte das Schmelzen nicht so scharf wie bei der ganz reinen Substanz. Die Chloroformlösung gab einen Rückstand, der noch eine mäßige Tyrosinreaktion zeigte; er wurde mit wenig Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung sechsmal mit Chloroform ausgeschüttelt; der nunmehr erhaltene Rückstand wog 0,09 g; er gab eine kaum merkliche Tyrosinreaktion und zeigte alle Eigenschaften des Leucinurids; sein Schmelzpunkt lag bei 210°. Die erhaltene Menge Leucinurid entspricht 80% der ursprünglich vorhandenen Leucinmenge.

Dieses Beispiel zeigt wohl zur Genüge den Wert und die

Vorzüge der neuen Methode, so daß es diesbezüglich keiner weiteren Hinweise bedarf. Bezüglich der Ätherextraktion sei nochmals erwähnt, daß sie auch in einem Extraktionsapparat erfolgen kann; letzterer wird besonders dann zu verwenden sein, wenn im Wasser leichter lösliche Anhydride wie Valinurid und besonders Alanurid zu isolieren sind. Denn nur so kann man auch die letzteren annähernd quantitativ gewinnen, was z. B. bei Fütterungsversuchen mit Aminosäuren von besonderer Bedeutung ist, wenn es gilt, den eventuell unverändert in den Harn übergegangenen Anteil zu bestimmen, oder nachzuweisen, ob und in welchem Umfange Uramidosäurebildung stattgefunden hat.

Zum Schlusse möchte ich noch hervorheben, daß ich mit diesen Mitteilungen die Versuche keineswegs für abgeschlossen erachte. Insbesondere sollen noch nach der quantitativen Seite hin, ferner in bezug auf die Trennung von Amidosäuren der Glykokollreihe und bezüglich des Nachweises von Glykokoll, Asparaginsäure und Glutaminsäure, deren Anhydride für die Isolierung durch Äther, wie schon erwähnt, nicht in Betracht kommen, weitere Versuche angestellt werden.

Ich gehe nun zu den Versuchen über, welche die Anwendung der Uramidosäurereaktion auf das Blut bezwecken. Es ist von vornherein klar, daß die Isolierung größerer Mengen (was unter diesen «größeren Mengen» zu verstehen ist, zeigen die beim Harn angeführten Beispiele) von Amidosäuren, eine sorgfältige Enteiweißung vorausgesetzt, hier nach den beschriebenen Methoden ebenso einfach ist wie im Harn, ja sogar insofern noch besser durchgeführt werden kann, als neben dem Eiweiß die Konzentration der übrigen Substanzen eine geringe ist, so daß hier der große Salz- und Harnstoffüberschuß wegfällt, daß ferner dieser Umstand ein viel stärkeres Konzentrieren der Aminosäure in einem bestimmten Volum und auch insofern gestattet, als größere Volumina auf einmal, ohne besondere Komplikationen seitens der sich anhäufenden übrigen Substanzen, verarbeitet werden können. Dies gilt, immer größere Mengen von Aminosäuren vorausgesetzt, natürlich in gleicher Weise auch für andere normale und patho-

logische Körperflüssigkeiten wie Speichel, Milch, Ascites-, Cystenflüssigkeiten usw.

Mir kam es also vor allem darauf an, festzustellen, welche Empfindlichkeit der Reaktion in einem bestimmten Falle zu erzielen ist. In diesem Sinne wurden die Versuche mit Blut, resp. Serum angestellt; natürlich kann die zu diesem Zwecke gewonnene Methode auch zur Isolierung größerer Aminosäuremengen verwendet werden, doch werden dann gegebenen Falles Vereinfachungen möglich sein. Es wurde folgendermaßen verfahren.

100 ccm Rinderserum, dem 0,01 g Leucin zugesetzt waren, wurden mit dem gleichen Volum gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und die Flüssigkeit auf ein Liter aufgefüllt. Nach ganz schwachem Ansäuern mit Essigsäure wurde in der Siedehitze koaguliert, heiß filtriert und das Koagulum ausgekocht; die vereinigten Filtrate wurden sodann durch Barythydrat von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom Baryt befreit; die entsprechenden Niederschläge wurden jedesmal abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde sodann an der Wasserstrahlpumpe zur Trockene verdunstet: Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert, durch Zusatz von Schwefelsäure auf einen Gehalt von 5% an derselben gebracht und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Nach Entfernung der letzteren mit Baryt und des Baryts mit Kohlensäure wurde das Filtrat am Wasserbade zur Trockene verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, nochmals filtriert und das Filtrat neuerlich verdampft. Nun wurde mit möglichst wenig Wasser aufgenommen und die Lösung in einer kleinen mit Steigrohr versehenen Epruvette in der Weise, wie es in der vorhergehenden Abhandlung beschrieben wurde, 1 Stunde lang nach Zufügen von Harnstoff erhitzt. Beim Ansäuern mit Salzsäure wurde ein relativ reichlicher aus Nadeln bestehender, ätherbeständiger Niederschlag erhalten. Gleichzeitig mit dieser Probe waren in genau derselben Weise zwei weitere Proben mit je 100 ccm desselben Serums ausgeführt worden, das einmal ohne Leucinzusatz, im anderen Falle nach Zusatz von 0,005 g Leucin. Beide Proben fielen negativ aus. Es wurde

nun versucht, unter Anwendung verschiedener Enteiweißungsmethoden und unter verschiedenen sonstigen Modifikationen die Empfindlichkeit der Reaktion auf den sicheren Nachweis von 5 mg in 100 ccm zu steigern, ohne dabei größere Serum-mengen als 100 ccm zu verwenden, weil ja in Praxi häufig genug bei solchen Untersuchungen keine größeren Blutmengen zur Verfügung stehen. Leider gelang es bisher nicht, das gesteckte Ziel befriedigend zu erreichen, was mit Bezug auf gewisse Fragen, besonders bezüglich des Überganges resp. Auftretens freier Aminosäuren im Blute von besonderer Wichtigkeit gewesen wäre. Es scheint, daß gerade das Eiweiß bei der Koagulation Leucin mitreißt. Möglicherweise führt noch die Dialyse oder die Ultrafiltration zum Ziele. Vielleicht genügt schon die bis jetzt erreichte Empfindlichkeit zur Entscheidung mancher Fragestellungen; jedenfalls werden diese Untersuchungen fortgesetzt werden.
