

Studien über den Abbau des Histidins im Organismus des Hundes.

Von

Emil Abderhalden und Hans Einbeck.

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1909.)

Die Herkunft der Purinbasen und speziell der Harnsäure und deren weiteren Abbauprodukte im Organismus der Säugetiere ist durch zahlreiche Untersuchungen in weitgehender Weise aufgeklärt worden. Die frühere Annahme, daß die Eiweißkörper an der Bildung der genannten Stoffwechselprodukte beteiligt seien, ist wohl allgemein verlassen. Es existiert nun eine Aminosäure, nämlich das Histidin, die ihrer Konstitution nach Beziehungen zur Harnsäuregruppe besitzt. Histidin ist eine α -Amino- β -Imidazolpropionsäure. Es ist denkbar, daß beim Abbau dieser Aminosäure im Organismus der Säugetiere Produkte entstehen, die in irgend einer Weise in den Purinstoffwechsel eingreifen. Das Studium dieser Frage erschien uns noch deshalb von ganz besonderem Interesse, weil das Histidin in hervorragendem Maße am Aufbau des Globins, des Eiweißpaarlings des Hämoglobins, beteiligt ist. Wäre es gelungen, ein für das Histidin charakteristisches Abbauprodukt im Urin aufzufinden, so hätten wir ein Mittel gewonnen, um den Verbrauch an Hämoglobin direkt unter geeigneten Bedingungen zu verfolgen. Wir wollen gleich erwähnen, daß bis jetzt unsere Versuche nach dieser Richtung hin noch nicht erfolgreich waren. Sie sollen fortgesetzt werden. Es ist uns dagegen gelungen, die andere Fragestellung, nämlich ob beim Abbau des Histidins im Organismus des Hundes Produkte entstehen, welche in den Purinstoffwechsel direkt eingreifen, einigermaßen zu klären. Dieses Problem hat in neuester Zeit noch besondere Wichtigkeit durch die Feststellung von Wiechowski, daß im Urin des Menschen ganz geringe Mengen von Allantoin

zu finden sind, erlangt. Es war a priori die Möglichkeit gegeben, daß diese geringe Allantoinmenge mit dem eigentlichen Purinstoffwechsel in keiner direkten Beziehung steht.

Als Versuchstier verwendeten wir den Hund, weil bei diesem der Purinstoffwechsel in den verschiedenen Phasen am besten aufgeklärt ist. Die Versuche von Wiechowski hatten eindeutig ergeben, daß beim Abbau der Harnsäure Allantoin entsteht. Die Durchführung der Versuche war nun folgende. Die Versuchstiere erhielten eine bestimmte Nahrung. Wir bestimmten in dieser Periode die Allantoinausscheidung und in dem einen Versuche gleichzeitig auch Harnstoff, Ammoniak, Harnsäure und Purinbasen. Dann erhielt das Versuchstier eine größere Menge Histidin, und darauf folgte dann eine Nachperiode unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei der Vorperiode bestanden. Bei einer andern Versuchsreihe wählten wir den Hungerstoffwechsel als Grundlage. Die Durchführung der Versuche stieß auf größere Schwierigkeiten, als wir vermutet hatten. Die Resultate waren zwar ganz eindeutig. Wir fanden bei Verwendung einer einwandfreien Methode immer, daß selbst reichliche Zufuhr von Histidin keinen irgendwie in Betracht kommenden Einfluß auf die Menge des im Urin ausgeschiedenen Allantoins hat, auch die Purinbasen- und Harnsäuremenge blieb in engen Grenzen konstant. Wir können aus unsern Versuchen den Schluß ziehen, daß die Abbauprodukte des Histidins beim Hunde in keine direkten Beziehungen zu denen der Purinbasen treten.

Diese Erkenntnis wurde erst gewonnen, nachdem die ursprünglich verwandte Methode der Allantoinbestimmung aufgegeben wurde. Wir erhielten nämlich mit der von Wiechowski ursprünglich angegebenen Methode¹⁾ nach Histidinfütterung stets beträchtlich erhöhte Allantoinwerte im Urin. Der Versuch, aus dem gewonnenen Quecksilberacetatniederschlag das Allantoin zu isolieren, um es direkt zur Wägung zu bringen, ergab, daß der Niederschlag neben sehr wenig Allantoin noch andere, noch nicht näher aufgeklärte Produkte enthielt. Die zunächst

¹⁾ W. Wiechowski, Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel, Hofmeisters Beiträge, Bd. XI, S. 109, 1907.

erhaltenen Resultate waren damit hinfällig geworden. Eine weitere Störung in der Beurteilung des Einflusses des Histidins auf die Allantoinausscheidung wurde durch den Umstand herbeigeführt, daß besonders in einem Falle der Zufuhr von Histidin eine länger andauernde erhöhte Stickstoffausscheidung nachfolgte und dadurch eine klare Beurteilung der gewonnenen Resultate verunmöglicht wurde.

Wir wollen an dieser Stelle nur die beiden am besten gelungenen Versuche mitteilen. Der folgende Versuch ist an einer 6380 g schweren Hündin ausgeführt worden. Das Tier hungerte während der ganzen Versuchszeit. Es erhielt zweimal 5 g Histidinmonochlorhydrat. Das Allantoin hatten wir nach der alten Methode von Wiechowski bestimmt. Da wir, wie schon erwähnt, nachträglich erkannt hatten, daß diese Methode unter den vorliegenden Verhältnissen nicht einwandfreie Resultate liefert, sind die gefundenen Werte weggelassen. Der Harnstoff steigt nach Histidinzufuhr ganz beträchtlich an. Ebenso sind die Ammoniakwerte erhöht. Offenbar hängt diese Zunahme mit der mit dem Histidin zugeführten Salzsäure zusammen. Die Menge der Purinbasen und der Harnsäure ist gegenüber der Nachperiode etwas gesteigert. Die Zunahme ist jedoch so gering, daß wir es nicht wagen, sie in direkte Beziehung zur Histidinzufuhr zu bringen. (Tab. I.)

Beim folgenden Versuch verwendeten wir zur Bestimmung des Allantoins eine Kombination der alten Wiechowskischen Methode mit der von demselben Autor neuerdings angegebenen.¹⁾ Der Tagesharn wurde jedesmal auf 500 ccm aufgefüllt. Dann wurden 200 ccm davon bei schwach saurer Reaktion auf dem Wasserbad bis zum dünnflüssigen Sirup eingedampft. Den Rückstand verrieben wir mit Magnesiumoxyd zu einem festen Brei. Diesen rührten wir mit viel Alkohol gründlich durch, nutschten ab und wuschen den Rückstand vier- bis fünfmal mit Alkohol sorgfältig nach. Die alkoholische Lösung wurde

¹⁾ Wilhelm Wiechowski, Das Vorhandensein von Allantoin im normalen Menschenharn und seine Bedeutung für die Beurteilung des menschlichen Harnsäurestoffwechsels, Biochemische Zeitschrift, Bd. XIX, S. 368, 1909.

Tabelle I.

Datum	Gewicht in g	Einnahme	Harn- menge ccm	Gesamt- N g	Harnstoff-		Ammoniak-		Harn- säure g	Purin- basen- N g	Zu- sammen in % des Gesamt-N
					N	in % des Gesamt-N	N	in % des Gesamt-N			
1./2.	6,380	100 ccm H ₂ O per Sonde	126	2,3380	—	—	—	—	—	—	—
2./3.	—	„	130	2,2204	1,8032	81,2	—	—	—	—	—
3./4.	—	„	150	2,2736	1,9040	83,7	—	—	—	—	—
4./5.	5,800	5 g Histidinmonochlor- hydrat in 100 ccm Wasser = 1,3 g N.	200	3,7310	2,9540	79,2	0,3178	8,5	0,0044	—	—
5./6.	—	„	122	4,7980	3,8990	81,6	0,4312	9,0	0,0058	0,0013	0,15
6./7.	5,600	5 g Histidinmonochlor- hydrat in 100 ccm Wasser = 1,3 g N.	150	4,6515	3,6540	78,6	0,5152	11,1	0,0072	0,0016	0,19
7./8.	—	„	80	3,8465	3,0940	80,4	0,3304	8,6	0,0044	0,0009	0,14
8./9.	—	100 ccm H ₂ O	65	2,5340	2,100	82,9	—	—	—	—	—
9./10.	5,300	„	172	4,7110	4,0250	85,4	0,3052	6,5	0,0036	0,0007	0,09
10./11.	—	„	170	4,2560	3,6820	86,5	0,2086	4,9	0,0043	0,0009	0,12

dann auf dem Wasserbade fast zur Trockene verdampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung füllten wir in einen Meßkolben von 250 ccm und gaben 10 ccm 8 %iger Schwefelsäure und darauf so viel von einer 10 %igen Lösung von Phosphorwolframsäure hinzu, bis keine Fällung mehr erfolgte. Nun füllten wir auf 250 ccm auf und verwendeten 200 ccm der filtrierten Lösung zur Allantoinbestimmung nach der alten Wiechowskischen Methode.

Die Genauigkeit der angewandten Methode prüften wir in der Weise, daß wir zu 125 ccm Urin vom Menschen (1,87 g N) 0,3862 g Allantoin = 0,137 g N hinzufügten. Wir gewannen im Durchschnitt aus 2 Bestimmungen 0,142 g Stickstoff in Form von Allantoin wieder.

Wir haben aus dem Quecksilberacetatniederschlag das Allantoin isoliert. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und ohne vorhergehende Filtration auf dem Wasserbade eingeeengt. Nachdem das Gemisch auf ein kleines Volumen gebracht war, filtrierten wir. Das Filtrat war jedesmal völlig klar und fast farblos. Bei weiterem Eindampfen kristallisierte das Allantoin in schneeweißen, zu Drusen vereinigten Stäbchen aus. F. 234°. Beim Vermischen des so gewonnenen Allantoins mit aus Harnsäure dargestelltem Allantoin erhielten wir ebenfalls F. 234°.

0,0890 g Substanz brauchten 22,2 ccm $\frac{1}{10}$ -norm.-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_4H_6N_4O_3$:

N = 35,44 %

Gefunden:

34,91 %.

Es sei noch ausdrücklich hervorgehoben, daß wir außer Allantoin keine andere Substanz beobachtet haben.

Erwähnt sei ferner, daß insofern bei der Fällung mit Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung Vorsicht angebracht ist, als die Doppelverbindung erst im Überschuß des Fällungsmittels löslich ist. Wiechowski reinigt nach seiner neuen Methode das Allantoin durch Fälln seiner wässerigen Lösung mit Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung. Vom Niederschlage wird dann abfiltriert und das Filtrat auf Allantoin verarbeitet. Bei Anwendung dieser Methode ist darauf zu achten, daß ein genügender Überschuß an verdünnter Schwefelsäure vorhanden ist.

Die folgende Tabelle gibt die erhaltenen Resultate wieder.

Nach Eingabe von 1 g Stickstoff in Form von Histidinmonochlorhydrat tritt sofort Steigerung der Stickstoffausscheidung auf. Wie die Stickstoffwerte des täglich gelassenen Kotes zeigen, war die Resorption des Histidins eine gute. Die Allantoinausscheidung zeigt eine ganz geringe Steigerung am Tage der Verabreichung des Histidins. Dann folgt eine auffallende Verminderung der Allantoinwerte. Am Tage der wiederholten Verabreichung des Histidins tritt wieder eine Erhöhung der Allantoinausscheidung ein. Sie hielt auch am folgenden Tage noch an. Vergleicht man die einzelnen Werte während des ganzen Versuches, dann ergibt sich, daß die Zufuhr von Histidin einen nur geringfügigen Einfluß auf die Allantoinbildung hatte. Wir wagen nicht, aus diesem Versuche den Schluß zu ziehen, daß aus Histidin Allantoin entstanden sei, und glauben behaupten zu dürfen, daß kein Grund vorliegt, von der Annahme abzuweichen, daß beim Hunde das Allantoin nur vom Purinstoffwechsel her stammt.

Wir möchten nicht unerwähnt lassen, wie außerordentlich leicht derartige Versuche zu ganz unrichtigen Schlüssen führen können. Würde man zum Beispiel die Allantoinausscheidung am 12./13. und 13./14. als Grundlage wählen, dann würde man zu dem Schlusse kommen, daß das per os eingegebene Histidin einen ganz beträchtlichen Einfluß auf die Allantoinbildung hat. Ein Blick auf die Vorperiode zeigt jedoch, daß die erwähnten niedrigen Werte unmöglich als Normalwerte angesehen werden dürfen. Vielleicht gibt die weitere Verfolgung des auffallenden Absinkens der normalen Allantoinwerte nach Histidinzufuhr uns doch noch einen Einblick in Wechselbeziehungen zwischen Abbauprodukten des Histidins und der Purinbasen.

Wir werden jedenfalls den Abbau des Histidins im Organismus verschiedener Tiere noch weiter verfolgen. Es wird vor allen Dingen von Interesse sein, festzustellen, ob gleichzeitige Zufuhr von Histidin und von Pyrimidinderivaten zu Produkten führt, die direkte Beziehungen zur Harnsäuregruppe

Tabelle II.

Datum	Gewicht g	Einnahme N im Futter ¹⁾ in g	Harn-		Kot-		Ausgabe Gesamt- N in g	Bilanz in g	Allantoin	
			Menge in cem	N in g	Trocken- gewicht in g	N in g			N in g	In % des Gesamt- stickstoffs
3./4. 7./09	6800	2,1	94	2,80	7,9	0,23	3,03	-0,97	—	—
4./5. „	6770	2,1	73	1,63		0,24	1,87	+0,23	—	—
5./6. „	6800	2,1	109	1,82	5,4	0,33	2,15	-0,05	0,099	5,4
6./7. „	6800	2,1	94	1,70	7,6	0,41	2,11	-0,01	0,088	5,5
7./8. „	6800	2,1	153	1,99	10,7	0,42	2,41	-0,31	0,098	5,0
8./9. „	6800	2,1	110	1,63	6,0	0,37	2,00	+0,10	0,097	6,0
9./10. „	6800	2,1 g N in Form von Fleisch und 1 g N als Histidinmono- chlorhydrat	160	2,51	11,3	0,44	2,95	+0,15	0,114	4,5
10./11. „	6800	2,1	133	2,22	7,8	0,33	2,55	-0,45	0,064	3,0
11./12. „	6830	2,1	78	1,66	12,7	0,51	2,17	-0,07	0,052	3,1
12./13. „	6900	2,1	108	1,63	5,6	0,29	1,92	+0,18	0,028	1,8
13./14. „	6900	2,1	116	1,55	8,2	0,42	1,97	+0,13	0,010	0,8
14./15. „	6950	2,1 g N + 1 g N als Histidin- monochlorhydrat	87	2,17	10,4	0,45	2,62	+0,48	0,120	5,5
15./16. „	6970	2,1	125	1,92	7,2	0,32	2,24	-0,14	0,113	5,8
16./17. „	6980	2,1	154	1,82	—	—	—	—	0,074	4,1
17./18. „	7000	2,1	100	1,87	Diarrhöe	—	—	—	—	—

¹⁾ Das Futter bestand während der ganzen Dauer des Versuches aus: 20 g getrocknetem Pferdefleisch, 70 g Stärke, 20 g Fett und 25 g Rohrzucker.

haben. Pyrimidinderivate selbst liefern nach Steudel¹⁾ bei der Verfütterung an Hunde keine Purinkörper. Steudel verfolgte nach Verfütterung von Pyrimidinderivaten die Harnsäurebildung. Da nun nach den Beobachtungen von Wiechowski im Organismus des Hundes entstehende Harnsäure fortwährend in Allantoin übergeführt wird, so wird man in Zukunft beim Hunde die Beziehungen bestimmter Verbindungen zur Purin-Gruppe in erster Linie durch Verfolgung der Allantoinbildung zu prüfen haben.

Das zu den Versuchen verwendete Histidin haben wir aus roten Blutkörperchen vom Pferde dargestellt. Wir hielten uns an die bekannten Vorschriften. Das zeitraubende Kochen der mit Soda alkalisch gemachten Lösung bis zum Aufhören der Ammoniakentwicklung ist nicht unbedingt nötig. Bei der Krystallisation des salzsauren Histidins erhält man zunächst reines Histidinmonochlorhydrat.

0,3366 g Substanz brauchten 15,6 ccm $\frac{1}{10}$ -norm.-AgNO₃-Lösung.

Berechnet für C₆H₉N₃O₂ · HCl + H₂O: Gefunden:

Cl = 16,9% 16,5%

N-Bestimmung nach Kjeldahl:

0,3226 g Substanz brauchten 45,3 ccm $\frac{1}{10}$ -norm.-H₂SO₄.

0,2750 „ „ „ 38,4 „ „

Berechnet für C₆H₉N₃O₂ · HCl + H₂O: Gefunden:

N = 20,1% I. 19,7%

II. 19,6%

Bei weiterem Einengen der Mütterlauge krystallisiert schließlich, wenn die Konzentration der Salzsäure eine genügend große geworden ist, Histidindichlorhydrat aus. Es ist uns bis jetzt nicht gelungen, den mit Sublimat erhaltenen Niederschlag restlos aufzuarbeiten. Es verbleibt schließlich nach der Abscheidung des Histidindichlorhydrates ein sirupöser Rückstand. Er enthält ohne Zweifel noch Histidin. Manche Beobachtungen deuten jedoch daraufhin, daß daneben noch andere Produkte vorhanden sind. Störend wirkt bei der Verarbeitung dieses Rückstandes einmal ein ganz beträchtlicher

¹⁾ Vgl. H. Steudel, Das Verhalten einiger Pyrimidinderivate im Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 285, 1901, und Fütterungsversuche in der Pyrimidingruppe, Ebenda, Bd. XXXIX, S. 136, 1903.

Eisengehalt — vom Hämatin stammend — und dann das gebildete Chlorammon. Erwähnt sei die Beobachtung, daß durch Kuppelung mit Pikrolonsäure ein Produkt abgeschieden werden kann, das sich vom Histidinpikrolonat durch die hellere Färbung und durch den höheren Schmelzpunkt unterscheidet.

Histidinmonochlorhydrat krystallisiert aus 2 Teilen Wasser, wie bereits bekannt, mit einem Molekül Wasser, das erst bei längerem Erhitzen im Vakuum auf 165° abgegeben wird. Welche Rolle das Wasser im Histidinmonochlorhydratmolekül spielt, erscheint uns nach unseren Beobachtungen noch nicht aufgeklärt.

0,2809 g Substanz verloren 0,0264 g an Gewicht.

Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$:	Gefunden:
8,6% H_2O .	9,5%.

Chlorbestimmung des im Vakuum erhitzten Präparates:

0,2546 g Substanz brauchten 12,75 ccm $\frac{1}{10}$ -n.- $AgNO_3$.

Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl$:	Gefunden:
18,35%.	17,7%.

Der etwas zu hohe Wert für Wasser und der etwas zu niedrige für Chlor erklärt sich damit, daß bei dieser hohen Temperatur etwas Salzsäure verloren geht. Das oben erwähnte Entweichen von Wasser beim Erhitzen von Histidinmonochlorhydrat kommt auch bei der Bestimmung des Schmelzpunktes zur Beobachtung. Beim Erhitzen des Histidinmonochlorhydrates im Schmelzpunktsröhrchen beobachtet man zwischen 160 und 165° Erweichen. Der eigentliche Schmelzpunkt liegt bei 255° . Ein Gemisch von Mono- und Dichlorhydrat schmilzt unter heftigem Aufschäumen bei 165° . Oft wird bei stärkerem Erhitzen die Schmelze wieder fest, und es tritt dann gegen 250° die endgültige Zersetzung ein.

Übergießt man fein gepulvertes Histidinmonochlorhydrat mit 2 Teilen konzentrierter Salzsäure, so tritt zunächst völlige Lösung ein. Nach kurzer Zeit erstarrt die ganze Masse zu einem Krystallbrei. Der erhaltene Körper schmilzt, ohne vorher zu sintern, bei 245° . Mehrstündiges Erhitzen des so gewonnenen Histidindichlorhydrats auf 165° ließ keinen wesentlichen Gewichtsverlust erkennen. Selbst nach 4stündigem Erhitzen auf 180° blieb der Chlorgehalt noch annähernd der berechnete.

1 : 150. Beim Erhitzen im Kapillarröhrchen schwärzt es sich gegen 225° , bei 265° tritt Zersetzung ein.

Wir haben mit den reinen salzsauren Salzen des Histidins das Drehungsvermögen bestimmt und im wesentlichen die bereits vorhandenen Angaben bestätigt gefunden.

Histidinmonochlorhydrat.

0,4438 g in 5,4544 g wässriger Lösung drehen $+ 0,13^{\circ}$.

Dichte der Lösung = 1,030.

$[\alpha]_{20}^D$ berechnet für Histidinmonochlorhydrat ohne H_2O = $1,70^{\circ}$ nach rechts. (Kossel $1,74^{\circ}$ nach rechts.)

Histidindichlorhydrat.

0,4070 g in 5,3202 g Lösung drehten $+ 0,60^{\circ}$. Dichte der Lösung = 1,030.

$[\alpha]_{20}^D = + 7,61^{\circ}$ nach rechts.

Histidinmonochlorhydrat $+ 1$ Mol. HCl.

0,4242 g Histidinmonochlorhydrat $+ 2$ ccm norm. HCl $+ H_2O$. Gewicht der Lösung 5,5636 g. Dichte der Lösung 1,033. Die Lösung drehte $+ 0,60^{\circ}$.

$[\alpha]_{20}^D = + 7,01^{\circ}$ berechnet, für Histidinmonochlorhydrat ohne $H_2O + HCl$.
