

Die Formoltitration der Aminosäuren im Harn.

Vorläufige Mitteilung.

Von
Dr. H. Malfatti.

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1909.)

In der Zeitschrift für analyt. Chemie, Bd. XLVII, S. 273, habe ich eine Methode beschrieben, um im Harn das Ammoniak mit für klinische Zwecke ausreichender Genauigkeit zu bestimmen¹⁾ und zwar in der Weise, daß in dem stark verdünnten Harn die übliche Aciditätsbestimmung vorgenommen, dann nach dem Eintritt der Neutralität Formol zugefügt und bis zum neuerlichen Auftreten des Farbumschlags (Phenolphthalein) weiter titriert wird. Dabei ergab sich bei normalen Harnen eine auffallend gute Übereinstimmung der nach Schlösing (und durch Vakuumdestillation, nicht aber nach Folin) erhaltenen Ammoniakwerte, mit den durch Formoltitration gefundenen. Nur in einem Falle zeigte der Harn eines an Cholangitis leidenden Patienten recht merkliche Differenzen zwischen den beiden Bestimmungsmethoden, die ich auf die Anwesenheit von Aminosäuren zurückführen mußte.

Später habe ich noch mehrfach im Harn von Leberleidenden und in einem Falle von Typhus dieselbe Erscheinung beobachtet. Normale Harnen habe ich nur mehr in wenigen Fällen daraufhin untersucht und stets die gute Übereinstimmung zwischen Formoltitration und direkter Ammoniakbestimmung gefunden. Ich bemerke das hier, da ich einer brieflichen Mitteilung von Hr. L. de Jager, Stiens, Niederland, entnehme, daß

¹⁾ Die Priorität für den Vorschlag hat mit vollem Recht A. Ronchèse reklamiert. Es ist überflüssig, zu bemerken, daß ich meine Arbeit ganz unabhängig von Ronchèse durchgeführt habe; sie war schon lange eingesendet, ehe die ersten Referate von Ronchèses Arbeiten in deutschen Zeitschriften erschienen. An dem ausnahmsweise verspäteten Erscheinen meiner Arbeit l. c. bin ich nicht schuld.

er so günstige Resultate nicht erzielen konnte. Es ist sehr möglich, ja eine Reihe von Angaben in der Literatur lassen es höchst wahrscheinlich erscheinen, daß Klima, Lebensweise und Rasse in verschiedenen Landstrichen bedeutende Unterschiede bedingen, und daß der «normale» Harn in bezug auf Acidität, auf Phosphat- oder Ammoniakgehalt usw. und vielleicht auch in bezug auf Gehalt an Aminosäuren recht verschiedene Mittelwerte zeigt. Um ein Beispiel anzuführen, sind hier in Innsbruck normale von Phosphaten trübe (alkalische) Harne, die in manchen Publikationen als pathologisch bezeichnet werden, an der Tagesordnung; Harne, in denen die Acidität höher ist, als dem gesamten Phosphorsäuregehalt entspricht, sind selten, andernorts scheinen die Verhältnisse gerade umgekehrt zu liegen (cf. H. Dreser, Elberfeld, Über Harn-Acidität. Hofmeisters Beitr. Bd. VI, S. 177). Vielleicht hängt es auch damit zusammen, daß es hier nahezu unmöglich ist, einen Fall von echter Gicht zur Beobachtung zu bekommen.

Da es nun gelungen war, in pathologischen Harnen eine auf Anwesenheit von Aminosäuren zurückzuführende Differenz zwischen Formoltitration und sonstiger Ammoniakbestimmung festzustellen, lag es nahe, auch in solchen Harnen, welche sich «normal» verhielten, mit Hilfe der Formolreaktion kleine Mengen von Aminosäuren, besonders von Glykokoll, aufzusuchen, denn es war ja möglich, daß die gute Übereinstimmung zwischen dem auf verschiedenem Wege erzielten Ammoniakwerte dadurch bedingt wurde, daß die Empfindlichkeit der Aminosäuren für Formaldehyd in so verdünnter Lösung nur eine sehr geringe ist, sodaß bemerkliche Mengen davon der Formoltitration entgehen konnten. Nach den Angaben von Schiff und Soerensen ist das geradezu zu erwarten.

Einige aufklärende Versuche, die ich damals anstellte, hatten mir aber ein ganz anderes, durchaus befriedigendes Resultat ergeben, wenigstens insoweit Glykokoll, die für den normalen Harn wichtigste Aminosäure, in Betracht kam. Ich habe nämlich Harn und Aminosäurelösungen in der Weise titriert, daß ich die für Phenolphthalein neutrale Lösung mit 3 ccm neutralen Formols (bei ammoniakreichen Harnen auch mehr) versetzte und weiter titrierte, bis wieder Neutralität eintrat; dann wurde wieder 1 ccm Formol zugesetzt, und wenn dadurch ein Farbumschlag nach der sauren Seite eintrat, wieder weitertitriert und so fort, bis endlich weiterer Formol-

zusatz keinen Farbumschlag hervorrief. Bei unverdünnten Lösungen von Aminosäuren und bei normalen Harnen trotz der Verdünnung (10 : 60) war die Reaktion gewöhnlich schon nach den ersten Formolzusätzen beendet. Wenn aber stark-gewässerte Aminosäurelösungen titriert wurden, oder Harn, welche neben Ammoniak auch diese Körper enthielten, dann mußte die nachträgliche portionsweise Formolzugabe vielmal wiederholt werden, bis endlich definitive, und dann oft noch schwer erkennbare Neutralität eintrat. Dieses verzögerte Auftreten der Endreaktion kann geradezu als Probe auf die Anwesenheit von Aminosäuren in größerer Menge in pathologischen Harnen benutzt werden.

Die Versuche ergaben nun, daß stärkere Lösungen von Aminosäuren sich mit Formol leicht und gut titrieren lassen, ebenso verdünnte Lösungen nach Zusatz des gleichen Volumens Alkohol. Verdünnung der Stammlösung mit Wasser (10 : 60) hatte bei Glykokoll keinen namhaften Einfluß auf das Endresultat, nur mußte eben in der oben beschriebenen Weise viel Formol nachgegeben werden. Bei Alanin wurden noch halbwegs befriedigende Werte erhalten, bei Valin, Leucin, Tyrosin und einem Aminosäurengemisch aus Eiweiß waren die Resultate nicht befriedigend.

Wie weit die Möglichkeit des Nachweises reicht, möge folgender Versuch zeigen. 0,1 g Glykokoll (Mercksches Präparat ohne Trocknung oder sonstige Vorbereitungen) wurde in 100 ccm Wasser gelöst. 10 ccm dieser Lösung, die der Theorie nach 1,87 mg Aminostickstoff enthalten sollte, mit Formol titriert verbrauchte 1,7 und 1,8 ccm der n_{14} -Lauge entsprechend 1,75 mg Stickstoff. Dieselbe Menge der Lösung mit 50 ccm Wasser verdünnt verbrauchte 1,7 und 1,7 ccm Lauge.

Ein ziemlich hellgefärbter, sehr schwach saurer und ammoniakarmer Harn von 1,019 spez. Gew. verbrauchte für 10 ccm, die mit 50 ccm Wasser verdünnt wurden 1,9 ccm Lauge zur Formoltitration (im unverdünnten Zustande verbrauchte dieser Harn ebensoviel Lauge, jedoch bei sehr unsicherer Ablesung). Je 10 ccm dieses Harns wurden mit 10 ccm der obigen Glykokollösung versetzt und nun direkt oder nach dem

Verdünnen mit 40 ccm Wasser titriert. Bei bester Übereinstimmung der Kontrollbestimmungen wurde in beiden Fällen ein Laugeverbrauch von 3,6 ccm beobachtet, sodaß sich für das absichtlich zugesetzte Glykokoll auch hier ein Laugeverbrauch von 1,7 ccm berechnet.

Dieser Versuch wurde mit gleichem Resultat an mehreren Harnen wiederholt: bei stark sauren, dunkeln und ammoniakhaltigen Harnen, die selbst im Verdacht stehen mußten, Aminosäuren zu erhalten, wurden entsprechend den Schwierigkeiten einer genauen Endablesung Fehler bis zu 0,5 ccm n_{14} -Lauge beobachtet: aber selbst für die ungünstigsten Fälle muß das Ergebnis der Versuche dahin zusammengefaßt werden, daß 10 mg Glykokoll (= 1,7—1,8 mg Stickstoff) in 60 ccm Reaktionsflüssigkeit nicht übersehen werden können.

Dieses Resultat ist durchaus kein glänzendes: denn es müßte ein Harn in ungünstigen Fällen 0,1% Glykokoll enthalten, um bei der eben beschriebenen Titrationsmethode eine halbwegs genaue Bestimmung zuzulassen. Wenn es aber gelang, die Titration im unverdünnten oder im eingedampften Harn vorzunehmen, so konnte die Empfindlichkeit wohl bedeutend gesteigert werden. Darum versuchte ich Harne nach Schlösing oder im Vakuum unter den verschiedensten Modifikationen (besonders auf Zusatz von Bleiacetat) vom Ammoniak zu befreien und den filtrierte Rückstand mit Formol zu titrieren. Die Versuche ergaben, daß in allen «normalen» Harnen diese Rückstände etwas formoltitrierbare Substanz enthielten entsprechend 2—6 mg Stickstoff für 100 ccm Harn; in pathologischen Harnen (es wurde nur der eingangs erwähnte Typhusfall untersucht mit 13—14 mg Reststickstoff) fand sich bedeutend mehr. Die Unannehmlichkeit der Versuche und ihre ganz unsicheren Resultate — so zeigte z. B. derselbe Harn, der während des Versuches etwa auf die Hälfte eingedunstet war, fast den gleichen Wert wie der nicht konzentrierte Harn — veranlaßten mich, die weitere Verfolgung der Frage abzubrechen. Nur ein Resultat scheint erwähnenswert. Wurde nämlich ein Harn in beschriebener Weise untersucht und dann nach 1—2-tägigem Stehen oder nach 18—14-tägigem Aufbewahren unter

Toluol derselben Probe unterworfen, so zeigte sich die Menge der formoltitrierbaren Substanz um das 3—4fache vermehrt.

Die Versuche hatten das eine Ergebnis geliefert, daß Aminosäuren, besonders Glykokoll, in den untersuchten normalen Harnen vielleicht vorkommen, aber jedenfalls nur in recht geringen Mengen.

Da erschien die Arbeit von V. Henriques: «Über quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn» (Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 1), aus welcher sich ergibt, daß einerseits die Aminosäuren im Harn mit hochgradiger Genauigkeit aus der Differenz zwischen den Werten der Ammoniakbestimmung und der von Soerensen angegebenen Formoltitrierung bestimmbar seien, andererseits daß der Gehalt an Aminostickstoff im normalen Harn bei gemischter Kost ganz unerwartet hoch sei. Der Gehalt der von Henriques untersuchten Harn an Glykokoll berechnet sich auf ungefähr 0,2%.

Nun erscheint allerdings die von Henriques angewandte Methode nicht einwandfrei; es geht nicht an, den auf Lackmusneutralität gebrachten Harn mit Phenolphthalein weiter zu titrieren, sonst wird die ganze Laugenmenge, welche der lackmusneutrale Harn braucht, um auch ohne Formolzusatz phenolphthaleinneutral zu werden, fälschlich den Ergebnissen der Formoltitration zugemessen.

Folgendes Beispiel möge das zeigen. Der Harn eines gesunden, nur für sein Alter zu fetten Mannes zeigte das spezifische Gewicht 1,029, ziemlich dunkle Farbe und setzte schon nach kurzem Stehen reichliche Harnsäurekrystalle ab. Auf 100 ccm Harn berechnet betrug die Acidität 143 mg Salzsäure, der Ammoniakstickstoff nach Schlösing bestimmt 42,8 und 42,0 mg, nach der Formoltitration (10 : 60 verdünnt) aber 38, 39 und 41 mg. Dieser Harn wurde nach Henriques mit Baryumhydrat und -chlorid vorbehandelt. Die erhaltene Lösung zeigte auf 100 ccm Harn berechnet 41,5 mg Ammoniakstickstoff nach Schlösing. Die Formoltitration wurde so vorgenommen, daß zuerst zu der lackmusneutralen Flüssigkeit Lauge zugegeben wurde (12,5 ccm für 100 Harn), bis die Phenolphthaleinneutralität erreicht war, dann erst wurde Formol zugefügt und weiter

titriert. Nun, ergab sich in bezug auf den ersten Neutralitätspunkt (Lackmus) eine durch Formol titrierbare Stickstoffmenge von 52,5 mg, in bezug auf den zweiten (Phenolphthalein) eine solche von 40,5 mg. 41,5 ist aber die nach Schlösing ermittelte Ammoniakmenge. Für den ersten Fall mußte man dem Harn einen Glykokollgehalt von 0,06% zusprechen, im letzteren Falle zeigte die Formoltitration ein Defizit von 1 mg Stickstoff, was ganz den im unvorbereiteten Harn ermittelten Verhältnissen entspricht.

Ich habe in diesem Falle die Formoltitration nach der mir gewohnten Methode mit $n/14$ -Lauge und unter Beobachtung des eben eintretenden Farbumschlags durchgeführt, nur die Verdünnung erschien infolge der Vorbehandlung unnötig. In zwei andern Fällen verwendete ich die Methode von Soerensen, die gleichartige Differenzen aufwies; doch erscheinen mir diese Resultate, wohl infolge mangelnder Übung, vielleicht auch infolge der besonderen Verhältnisse im Harn, viel unsicherer.

Da in dem mit Baryumchlorid und -hydrat vorbehandelten Harn¹⁾ die Notwendigkeit einer Verdünnung mit Wasser vor der Formoltitration wegfällt, ist also die Methode von Henriques, richtig durchgeführt, eher imstande, kleine Mengen von Aminosäuren im Harn nachzuweisen als die direkte Formoltitrierung im Harn. Trotzdem hat sich in dem oben erwähnten Falle Aminostickstoff nicht nachweisen lassen.

Ein recht mißlicher Umstand ist es auch, daß bei allen diesen Methoden die Aminosäuren aus der Differenz der Formoltitration und einer Ammoniakbestimmung berechnet werden müssen. Ich habe daher versucht, die Aminosäuren im Harn direkt mit Formol zu titrieren, nachdem das Ammoniak entfernt war und zwar nicht wie in den früher erwähnten Versuchen durch Abdunstung, sondern durch Fällung. Quecksilbersalze haben nämlich, wie bekannt, die Fähigkeit, in neutraler oder schwach alkalischer Lösung Ammoniak selbst in größter Verdünnung zu fällen. Aminosäuren jedoch, besonders die

¹⁾ Es ist mir aufgefallen, daß solche Harne stets etwas weniger Ammoniak enthielten als der native Harn, wahrscheinlich infolge Abscheidung von etwas Ammoniummagnesiumphosphat.

kohlenstoffarmen, werden nicht gefällt, ja sie lösen sogar frisch gefälltes Quecksilberoxyd mit Leichtigkeit auf.

In wässriger Lösung ist es somit leicht, Ammoniak und Aminosäuren zu trennen, im Harn aber scheint die Reaktion etwas weniger glatt zu verlaufen, doch scheint mir vorläufig folgende Versuchsanordnung recht brauchbare Resultate zu geben.

In etwa 50 ccm des Harns werden je nach der vorhandenen Ammoniakmenge 2—4 g Quecksilberchlorid gelöst, und dann in kleinen Portionen gepulvertes kohlen-saures Natron eingetragen, bis sich eben merkliche alkalische Reaktion auf Lackmuspapier zeigt. (Stärkerer Zusatz von Soda oder andern Alkalien etwa bis zur Rötung von Phenolphthalein hat merkwürdigerweise in wässriger Lösung keine, im Harn aber sehr bedeutende Glykokollverluste zur Folge.) Die entstandene Fällung wird abfiltriert, das Filtrat rasch mit einigen Tropfen Eisessig versetzt (da es sonst beim Entweichen der gelösten Kohlensäure sich stark trübt) und nun mit Schwefelwasserstoff das überschüssige Quecksilber daraus entfernt. Von dem entstandenen Quecksilbersulfid wird wiederum abfiltriert und eine gemessene Menge des Filtrates — die man ohne besonderen Fehler demselben Volumen des ursprünglichen Harnes gleichsetzen kann — der Formoltitration zugeführt, nachdem man daraus die Kohlensäure und den Schwefelwasserstoff durch Erwärmen, am besten unter Luftdurchleiten entfernt hat.

In einigen Fällen habe ich auch den Schwefelwasserstoff samt andern Harnbestandteilen durch gepulvertes essigsäures Blei, und dieses wiederum durch Soda entfernt; die Titration wird dadurch bedeutend erleichtert, ohne daß die größere Umständlichkeit des Verfahrens nachweisbare Glykokollverluste ergeben hätte.

Da die Titration trotz der Klärung des Harns Schwierigkeiten aufweist, verfuhr ich so, daß zuerst die gesamte Flüssigkeit mit Phenolphthalein versetzt und durch tropfenweise Zugabe erst starker, dann verdünnter Kalilauge soweit neutralisiert wurde, bis eben ein deutlich merkbarer Farbenschlag eintrat. Dann wurde die Flüssigkeit in zwei ganz gleiche Bechergläschen verteilt, so daß beide Proben die gleiche Farbennuance

zeigten und gegenseitig als Kontrollprobe verwendet werden konnten, indem erst eine Probe mit Formol versetzt und für den Fall, daß Entfärbung auftrat, mit $n/14$ -Lauge titriert wurde, bis die Farbnuance der zweiten Probe erreicht war, worauf dann die zweite Probe unter Formolzusatz bis zur Nuance der ersten titriert wurde. Das verwendete Formol diente gleichzeitig zum Auswaschen des ursprünglich verwendeten Becherglases.

Die Brauchbarkeit der Methode wurde geprüft, indem zu Harnen teils Chlorammonium, teils Aminosäuren (0,05 g Glykokoll auf 50 Harn) zugesetzt, und die Resultate mit den im Harn ohne Zusatz erhaltenen verglichen wurden. Es stellte sich heraus, daß Ammoniak in vollständig befriedigender Weise aus dem Harn entfernt wird. In bezug auf die quantitative Glykokollbestimmung sind die Resultate weniger befriedigend. Auf 100 Harn berechnet sollten 17—18 mg Glykokollstickstoff gefunden werden; gefunden wurden 13—16 mg, in den zuletzt ausgeführten Bestimmungen allerdings immer 15—16 mg. Vielleicht rühren diese Verluste her von den Schwierigkeiten des Vergleiches mit dem Ergebnis der Titration im ursprünglichen, also ganz oder fast glykokollfreien Harn, möglicherweise kommt auch eine Absorption des Glykokollquecksilbers an den starken Niederschlag oder gar Oxydation durch die Quecksilbersalze in Betracht.

Daraus ergibt sich, daß die Methode, auf den Harn angewandt, nicht absolute, wohl aber recht gute Vergleichswerte liefern kann und daß ihre Empfindlichkeit auf 3—4 mg Glykokollstickstoff für 100 Harne geschätzt werden darf.

Was nun die Resultate anbelangt, die ich an normalen Harnen gefunden habe, so sei bemerkt, daß Doppelanalysen am gleichen Harn befriedigend übereinstimmen. Sonst aber scheinen eine Reihe von Einflüssen, speziell die Ernährung, starken Einfluß zu üben. So fand ich im Morgenharn einer gesunden Person kein sicher nachweisbares Glykokoll, d. h. Formol erzeugte zwar einen geringen Farbumschlag, aber einige Tropfen Lauge waren mehr als ausreichend, die Färbung wiederherzustellen. Am selben Tage nachmittags aber enthielt der Harn, auf 100 ccm berechnet, 16,5 mg formoltitrier-

bare Substanz, eine Menge, die sonst nur in pathologischen Harnen anzutreffen war. An andern Tagen konnte eine solche Differenz nicht nachgewiesen werden.

Durch mehrfache Versuche sicher gestellt ist aber die Beobachtung, daß der Harn beim Aufbewahren Glykokoll neu bildet. Folgende Versuchsreihe zur Bestätigung. Ein sehr lichter, schwachsaurer und ammoniakarmer Harn (Acidität 41,7 mg HCl, Ammoniakgehalt 24,3 mg in 100 Harn) gab mit Quecksilber behandelt und formoltitriert kein Resultat, d. h. Formol brachte keine deutliche Farbänderung hervor und ein Tropfen der Lauge stellte die Färbung wieder her. Derselbe Harn über Nacht unter Toluol bei 30° aufbewahrt, verbrauchte 2,8 ccm der $\frac{n}{14}$ -Lauge, nach 14 Tagen unter Toluol aufbewahrt 8,66 ccm, und beim offenen Stehen im Zimmer, bis er eben anfang gegen Lackmus alkalisch zu reagieren, 9,6 ccm, berechnet auf 100 ccm Harn.

Ob die so entstehende formoltitrierbare und durch Quecksilber nicht fällbare Substanz, ja ob auch die entsprechende Substanz des normalen Harns Glykokoll ist oder nicht, muß dahingestellt bleiben.
