

Nach C. Neuberg¹⁾ trifft die Angabe, daß die d-Milchsäure (Fleischmilchsäure) mit Jod und Alkalihydrat kein Jodoform gibt, nicht zu.

6. Aminosäuren.

Unter dem Namen Aminosäuren faßt man gewisse bei der Hydrolyse der Eiweißstoffe (Proteine) entstehende Spaltungsprodukte zusammen; die verschiedenen Eiweißstoffe enthalten die gleichen Aminosäuren, wenn auch hie und da die eine oder die andere Aminosäure fehlt.

Solche Aminosäuren sind unter anderen in der aliphatischen Reihe das Glykokoll, das Alanin, die Aminoisovaleriansäure, das Leucin, die Asparaginsäure, die Glutaminsäure, das Lysin, das Arginin, das Cystin und Cystein, zwei schwefelhaltige Aminosäuren; in der aromatischen Reihe sind das Phenylalanin und das Tyrosin zu nennen.

Ob Aminosäuren im normalen Harn ausgeschieden werden, dafür liegt, wie Abderhalden bemerkt, kein einwandfreier Beweis vor, höchstens Spuren von Aminosäuren könnte der normale Harn enthalten. Aus normalem Harn wurde mit Sicherheit Glykokoll isoliert. (Embden, Reese, Marx, A. v. Reuss.) Nach den Ergebnissen der Arbeiten von W. Henriques und S. P. L. Sörensen kommen sowohl Aminosäuren, als auch Polypeptide als normale Bestandteile im Menschenharn vor, so daß also jeder Harn kleine Mengen freier Aminosäuren enthält; der Aminosäurenstickstoff soll etwa 0,5–2,0% des gesamten Stickstoffes im Harn betragen. Aminosäuren werden gewöhnlich abgebaut, desamidiert, das abgespaltene Ammoniak dient zur Harnstoffbildung.

Häufig erscheinen Aminosäuren, manchmal in recht großer Menge, unter pathologischen Verhältnissen im Urin; so finden sich bei der akuten Leberatrophie Leucin und Tyrosin, bei der Cystinurie tritt Cystin auf; beträchtliche Mengen von Aminosäuren wurden bei Pneumonie besonders zur Zeit der Krise, bei Diabetes, Typhus, bei Leukämie und vor allem im Harn von Gichtkranken (hier Glykokoll) vorgefunden.

Die biologische Bedeutung dieser Aminosäuren ist noch wenig erforscht.

Die Aminosäuren sind, da sie in ihrem Moleküle die Carboxylgruppe und mindestens eine Aminogruppe enthalten, zugleich Säuren und Basen. Nach der Zahl der eingetretenen Aminogruppen unterscheidet man Mono-, Di- und Poly-Aminosäuren.

Als Säuren geben sie mit Metalloxyden und Metallhydroxyden Salze, in ihren alkoholischen (absoluter Alkohol) Lösungen durch Einleiten von Salzsäuregas Ester. (Th. Curtius.)

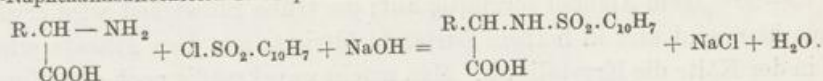
Als Basen geben sie mit Säuren Salze, werden durch die meisten Alkaloidreagenzien gefällt und liefern mit Benzoylchlorid, β -Naphthalinsulfochlorid und Phenylisocyanat in alkalischen Lösungen zu ihrer Isolierung und Kennzeichnung wichtige Verbindungen.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1912. 43. 500.

Nachweis und Darstellung der Aminosäuren.

Das von E. Fischer und P. Bergell¹⁾ zuerst angewandte Verfahren zur Bestimmung und Isolierung dieser Säuren hat A. Ignatowski²⁾ den klinischen Bedürfnissen anzupassen versucht. Auch J. Erben³⁾, dann E. Abderhalden und Lewellys, F. Barker⁴⁾, sowie viele andere haben mit Hilfe des β -Naphthalinsulfochlorids für die Klinik brauchbare Methoden zum Nachweise der Aminosäuren ausgearbeitet und empfohlen.

Das Verfahren gründet sich auf eine Umsetzung der Aminosäuren in alkalischer Lösung mit β -Naphthalinsulfochlorid zu Naphthalinsulfoaminosäuren.



Der zu untersuchende Harn (500 g) wird nach Ignatowski mit Bleizucker gefällt; wenn man das Vorhandensein größerer Mengen Leucin im Harne vermutet, verdünnt man den Harn vor der Fällung stark; aus dem Filtrate wird der Überschuß an neutralem Bleisalz mit Schwefelwasserstoff, dieser durch leichtes Erwärmen entfernt. Sehr zweckmäßig ist es, wenn man das Filtrat bis zur Hälfte des verwendeten Harnes unter vermindertem Drucke bei einer Temperatur von höchstens 45° eindampft. Die dann mit Salzsäure angesäuerte Lösung wird 3 Stunden lang mit Äther 2:1 mit Hilfe einer Schüttelmaschine geschüttelt, um Phenole, Oxysäuren usw. zu entfernen und der Äther abgegossen.

Da das Ammoniak des Harnes mit Naphthalinsulfochlorid reagiert, wird dieses erst entfernt; man dampft den Harn vor der Bleifällung bei schwach alkalischer Reaktion im Vakuum stark ab. Man verdünnt den Rückstand stark mit Wasser, fällt mit Blei usw.

Zu dem auf die soeben angegebene Weise vorbehandelten Harne setzt man β -Naphthalinsulfochlorid und zwar auf je 500 ccm nichtkonzentrierten Harnes 2 g in 10%iger ätherischer Lösung. Diese Mischung wird mit Kalilauge oder Normalnatronlauge leicht alkalisch gemacht und 9 Stunden geschüttelt. Im Laufe dieser Zeit setzt man in Abständen von 3 Stunden zweimal je 1 g des Reagens in Ätherlösung zu, wobei man einen zu großen Überschuß von Äther vermeidet und darauf achtet, daß die alkalische Reaktion der Mischung erhalten bleibt, außerdem setzt man Normalnatronlauge zu. Nach 9 Stunden wird der Äther abgegossen, die darunter befindliche Flüssigkeit durch Filtrieren geklärt und mit Salzsäure übersättigt. Wenn in der Mischung Aminosäuren enthalten sind, erhält man durch Salzsäurezusatz eine reichliche Trübung, die Flüssigkeit nimmt eine weißliche Färbung an und wird in seltenen Fällen milchfarben. Eine schwache Trübung zeigt auch jener Harn, der keine Aminosäuren enthält, deshalb ist es notwendig, aus der Flüssigkeit die Krystallverbindungen der Naphthalinsulfoaminosäuren zu isolieren. Selten scheiden sich die Krystalle von selbst aus, wenn der Harn der Kälte ausgesetzt ist, man muß meist eine weitere Behandlung anschließen. Man

¹⁾ Berl. Bericht. 1902. 35. 3779.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1904. 42. 371.

³⁾ Ebenda. 1904. 43. 320.

⁴⁾ Ebenda. 1904. 42. 524.

setzt zu der Flüssigkeit eine gleiche Menge Äther und schüttelt die Mischung 3 Stunden lang; der Niederschlag geht bei saurer Reaktion in den Äther über und zwar lösen sich die β -Naphthalinsulfoaminosäuren und zum Teil die Spaltungsprodukte des Naphthalinsulfochlorids. Die Ätherlösungen — man schüttelt noch zweimal mit neuen Äthermengen aus — werden mit kleinen Wassermengen gewaschen, um die Spuren Salzsäure zu entfernen. Den Äther verdampft man durch leichtes Erwärmen — man destilliert ihn ab, um ihn wieder zu gewinnen — und nimmt den Rückstand in kleinen Portionen mit 15–20%igem Alkohol sorgfältig auf; die trübe Flüssigkeit wird erwärmt, bis sie klar wird und in heißem Zustande filtriert; aus dem Filtrate scheiden sich in der Kälte die Krystalle ab. Man macht zweckmäßig noch eine Kontrolluntersuchung durch abermaliges Ausschütteln des wieder alkalisch gemachten Harns mit β -Naphthalinsulfochlorid, um zu sehen, ob alle Aminosäuren gebunden worden sind.

Die Verbindungen, die Naphthalinsulfoverbindungen des Glykokolls, Leucins, Tyrosins, Alanins und der Asparaginsäure, lösen sich leicht in Ammoniak, Äther, Alkohol, zum Teil auch in Benzol, schwer sind sie löslich in heißem, noch schwerer in kaltem Wasser; in verdünnten Alkalien sind sie alle löslich, beim Ansäuern der Lösungen fallen sie wieder aus.

Von großer diagnostischer Bedeutung ist die Fähigkeit, Äthylester zu bilden. Zu ihrer Darstellung werden nach E. Fischer¹⁾ die Lösungen der Naphthalinsulfoaminosäuren in der 10fachen Menge von absolutem Alkohol ohne Kühlung mit Salzsäuregas gesättigt; beim Eingießen der alkoholischen Flüssigkeit in kaltes Wasser scheidet sich der Äthylester als dicker Brei ab, der in der Kälte rasch krystallisiert. Die Ester lösen sich in Äther und in schwachen Alkalien auf und fallen beim Zusatz von Säuren aus. Die Äthylester krystallisieren leicht und besitzen scharfe Schmelzpunkte. Durch Verseifen der Ester oder der einzelnen Esterfraktionen gewinnt man die freien Aminosäuren (E. Abderhalden²⁾). Für den Harn wird die Methode aber wohl kaum in Betracht kommen.

Das β -Naphthalinsulfoglykokoll krystallisiert in langgestreckten zugespitzten Blättern, meist büschelförmig verwachsen, mit 156°³⁾ Schmelzpunkt. Der Äthylester schmilzt bei 79°. Das Bariumsalz des β -Naphthalinsulfoglykokolls ist zum Unterschiede von den Bariumsalzen der übrigen Aminosäuren in Wasser sehr schwer löslich; das Glykokoll scheidet sich mit dem β -Naphthalinsulfochlorid am leichtesten und sehr vollständig aus seinen Lösungen ab.

Das β -Naphthalinsulfoalanin stellt unter dem Mikroskope sehr feine, lange, spießartige Prismen dar. Schmelzpunkt 151° (korrig. 152 bis 153°), der Äthylester schmilzt bei 78°. (Ausbeute aber nur etwa 40%.)

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1901. 33. 154.

²⁾ Archiv exper. Patholog. Therap. 1906. II. 642.

³⁾ Naphthalinsulfoglykokoll 159° (korrig. Schmelzp.).

β -Naphthalinsulfo- δ -l-alanin 79–81° (wasserhaltig; wasserfrei 122–123°).

β -Naphthalinsulfo-l-leucin 68°.

Dinaphthalinsulfotyrosin (Natriumsalz) 252–254°.

Die β -Naphthalinsulfoverbindung des d,l-Leucins stellt in ganz reinem Zustande schmale, lange Blättchen dar, verlängerte Tafelchen mit 145—146° (korrig.) Schmelzpunkt; der Äthylester schmilzt bei 77°. Die Ausbeute beträgt nicht mehr wie 50%.

In unreinem Zustande kommen Formen von Stechäpfeln, radial gestreiften Kugeln vor.

Die Verbindung des Tyrosins mit β -Naphthalinsulfosäure bildet Drusen aus kleinen zugespitzten Krystallen; die Krystallisation erfolgt langsam. Schmelzpunkt 128—130°.

Die Hippursäure tritt mit β -Naphthalinsulfochlorid in keine Wechselwirkung, sie wird auch vorher durch Äther entfernt.

Die Herstellung und Trennung der einzelnen Aminosäuren ist sehr schwer; Ignatowski bediente sich des Verfahrens von E. Fischer, die Verbindungen bei andauerndem Erhitzen mit Salzsäure im geschlossenen Rohre bei 110—120° zu spalten. Man erhitzt mit der 10fachen Menge Salzsäure (1,19 spez. Gewicht) fünf Stunden lang, löst den Inhalt der Röhre in Wasser und filtriert. Das Filtrat dampft man ein, löst den Rückstand in Wasser und fällt die Lösung vorsichtig mit kleinen Mengen von Bleiessig; die sich bildenden Niederschläge filtriert man immer ab, da sie sich im Überschusse lösen. Den Überschuß von Bleiessig entfernt man durch Schwefelwasserstoff, dampft die Lösung der Aminosäuren ein, löst den Rückstand in Salzsäure, entfernt die Salzsäure durch Eindampfen und stellt aus den Chloriden die freien Aminosäuren dadurch her, daß man die Lösung der Aminosäurechloride mit frisch bereitetem Silberoxyd fällt, das Chlorsilber und das im Überschusse zugesetzte Silberoxyd entfernt und aus dem Filtrate die Aminosäuren durch Krystallisieren gewinnt.

Zur Identifizierung des Glykokolls führt man dieses in die Kupferverbindung über, was man durch Kochen der Aminosäurelösung mit Kupfercarbonat erreicht; das sehr charakteristische Kupfersalz bildet Nadeln, die in Wasser leicht, in Alkohol nicht löslich sind. Zur Trennung des Glykokolls von anderen Aminosäuren benützt man, wie schon oben erwähnt, die Barytsalze. Das Gemenge der verschiedenen Naphthalinsulfoaminosäuren wird nach E. Abderhalden und P. Bergell¹⁾ durch Zusatz der 20fachen Menge heißen Wassers und einiger Tropfen Ammoniak in Lösung gebracht; der Überschuß des Ammoniaks wird durch Erhitzen auf dem Wasserbade entfernt und zu dieser Lösung Bariumchloridlösung hinzugegeben. Der Niederschlag wird auf dem Porzellanfilter abgesaugt; er stellt das Bariumsalz des β -Naphthalinsulfoglykokolls dar, die Bariumsalze der übrigen β -Naphthalinsulfoaminosäuren gehen ins Filtrat über. Man zersetzt den Niederschlag mit Salzsäure, worauf man das Naphthalinsulfoglykokoll erhält. Der Umstand, daß die β -Naphthalinsulfoaminosäuren in Alkohol gut und in Wasser schlecht löslich sind, ermöglicht es, die Verbindungen durch Umkrystallisieren aus heißem 30%igem Alkohol zu reinigen.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1903. 39. 464.

Spaeth, Untersuchung des Harnes. 5. Aufl.

Das die Bariumsälze der anderen Naphthalinsulfoaminosäuren enthaltende Filtrat versetzt man mit Salzsäure und extrahiert die Säuren mit Äther. Zur Isolierung und Trennung der einzelnen Aminosäuren erhitzt man den Ätherrückstand mit Salzsäure wie Seite 145 angegeben oder man nimmt die Estermethode Seite 144 vor.

Zur weiteren Identifizierung verschiedener Aminosäuren kann man sich zweckmäßig der von C. Paal¹⁾ angegebenen Methode bedienen, die auf der Darstellung der Phenylisocyanatverbindungen beruht. Zur Darstellung dieser Verbindungen löst man die Säure in der zur Neutralisation nötigen Menge von Normallauge, kühlt stark ab und bringt allmählich unter Schütteln die erforderliche Menge Phenylisocyanat hinzu; man schüttelt bis zum Verschwinden des Cyanatgeruches, gibt Tierkohle zur Lösung, schüttelt wieder und filtriert. Das Filtrat wird angesäuert; es fällt anfangs eine meist harzige Masse aus, die allmählich krystallinisch wird und die aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert werden kann.

Beim Kochen der Phenylisocyanatverbindung mit 25%iger Salzsäure und nachherigem Eindampfen scheidet sich das Anhydrid krystallinisch aus.

Die Phenylisocyanatverbindung des Glykokolls schmilzt bei 195°, die des i-Leucins bei 165°.

C. Neuberg u. A. Manasse, O. Loewy u. C. Neuberg²⁾ geben eine Isolierung der Aminosäuren mit α -Naphthylisocyanat an. 1 Liter Harn wird im Vakuum auf 100 ccm eingengt und mit Natronlauge neutralisiert. Hierzu werden 5 g α -Naphthylisocyanat und 50 ccm n-Natronlauge zugesetzt; das Ganze wird mehrmals tüchtig geschüttelt; man läßt $\frac{1}{2}$ Stunde stehen, schüttelt wieder 3 Minuten und wiederholt diese Operation noch 1—2 mal. Man filtriert endlich vom Niederschlag (Dinaphthylharnstoff) ab und säuert das Filtrat an; die Verbindungen der Aminosäuren fallen aus und können aus Alkohol umkrystallisiert werden.

Über die direkte Isolierung von den für uns wichtigen Aminosäuren (Cystin, Tyrosin, Leucin) findet sich bei der Besprechung dieser Näheres angegeben.

Quantitative Bestimmung der Aminosäuren.

Über die Bestimmung der Aminosäuren ist eine reiche Literatur angewachsen, seit von Sørensen die „Formoltitration“ hiezu empfohlen worden ist. Da der Ermittlung des Wertes der Aminosäuren gegenwärtig eine wesentliche Bedeutung beigemessen wird, sollen die empfohlenen Methoden im Nachstehenden eingehendere Erwähnung finden, wobei es wohl am zweckdienlichsten sein wird, mit der Aufzählung der Methoden gewissermaßen chronologisch zu verfahren.

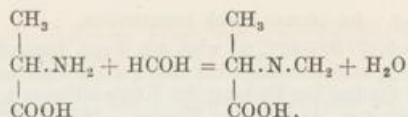
Prinzip.

Die Methode der „Formoltitration“, wie sie wohl am kürzesten genannt wird, ausgehend von den Angaben von H. Schiff³⁾, beruht darauf, daß ein Zusatz neutralisierter Formollösung zur Lösung einer Aminosäure die Trennung der Amin- von der Säurefunktion bewirken wird, indem die Aminogruppe wegen des Einflusses des Formols eine Methylenverbindung bildet, wodurch es möglich wird, die Menge der verschiedenen Carboxylgruppen titrimetrisch zu bestimmen. Der Verlauf (z. B. Alanin + Formol) ist folgender:

¹⁾ Berl. Bericht. 1894. 27. 974.

²⁾ Berl. Bericht. 1905. 38. 2359; Biochem. Zeitschr. 1906. 2. 438.

³⁾ Annal. Chem. 1900. 319. 59, 287; 1902. 325. 348; Zeitschr. analyt. Chem. 1911. 50. 528.



Mit der Formoltitrierung muß zugleich eine Ammoniakbestimmung im Harne vorgenommen werden, da sich ja Ammoniak mit Formaldehyd ebenfalls kondensiert. Man ermittelt daher in dem von Phosphaten befreiten, gegen Lackmus neutralisierten Harne einerseits das Ammoniak, andererseits durch Titrieren mit $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge oder -Barytwasser die Acidität, die der Harn durch die Bindung von Methylen aus dem Ammoniak und der Aminogruppe annimmt. 1 ccm $\frac{1}{5}$ n-Lauge = $\frac{14}{5}$ = 2,8 mg Stickstoff, vorhanden als Ammoniak- und als Monoaminosäuren-Stickstoff. Zieht man von dem Produkte 2,8 · der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{1}{5}$ n-Lauge die Anzahl Milligramme Ammoniak-Stickstoff ab, so erhält man die Menge des Aminosäuren-Stickstoffes, des formoltitierbaren Stickstoffs. Bei der neueren Methode werden auch die Aminosäuren berücksichtigt, die durch Spaltung mit Säure aus den in peptidartiger Bindung vorhandenen Substanzen freiwerden.

Sörensen u. Henriques haben ihr älteres Verfahren und die neue Ausführung desselben in der folgenden Weise mitgeteilt; es erübrigt sich daher, auf ihre früheren Abhandlungen weiter einzugehen.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptide und der Hippursäure im Harne durch Formoltitration von V. Henriques und S. P. L. Sörensen.¹⁾

Nach den Versuchsergebnissen glauben die Verfasser den Schluß ziehen zu dürfen, daß sowohl Aminosäuren, wie auch Polypeptide als normale Bestandteile des Harnes, auch im Menschenharn, regelmäßig vorkommen. Die Bezeichnungen „Aminosäuren“ und „Polypeptide“ wurden beibehalten, obwohl diese Namen den Ergebnissen der Formoltitration nicht vollständig entsprechen; es werden bei der Aminosäurenbestimmung z. B. nicht nur die in die eigentlichen Aminosäuren, (z. B. Glykokoll) eingehenden Aminogruppen, sondern auch die in den Polypeptiden und noch komplizierteren Eiweißabkömmlingen vorhandenen formoltitierbaren Aminogruppen bestimmt. Unter dem üblichen kürzeren Ausdruck „Aminosäurenstickstoff“ ist die neben dem Ammoniakstickstoff noch vorhandene formoltitierbare Stickstoffmenge zu verstehen; unter „Polypeptidstickstoff“ wird die peptidgebundene Stickstoffmenge verstanden.

Die Verfasser geben zu, daß die Beobachtung von L. de Jager²⁾ richtig ist, daß Ammoniumsalze zu niedrige Werte veranlassen können und daß die erwähnte Fehlerquelle von Bedeutung sein kann, wenn hinlänglich große Ammoniakmengen anwesend sind. Man darf bei Untersuchung sehr ammoniakreicher Harne und besonders solcher Harne, die zur Spaltung von Polypeptiden mit Salzsäure eingedampft worden sind, die erwähnte Fehlerquelle nicht außer acht lassen. Möglicherweise ist der Fehler in einer intermediären Entstehung von Methylenimin bei der Bildung von Hexamethylentetramin zu suchen.

A. Die alte Methode³⁾, zur Bestimmung von Ammoniak und von Aminosäuren brauchbar.

Erforderliche Reagenzien und Lösungen.

1. Phenolphthaleinlösung: 0,5 g. Phenolphthalein werden in 50 ccm Alkohol und 50 ccm Wasser gelöst.

2. Empfindliches Lackmuspapier: 0,5 g fein gepulvertes Azolitmin werden in einer Schale in 200 ccm Wasser + 22,5 ccm $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge gelöst und nach dem Filtrieren mit 50 ccm Alkohol versetzt. Durch die Lösung werden Streifen guten, aschenarmen Filtrierpapiers gezogen und auf Schnüren getrocknet, was etwa eine Stunde dauert. Das Papier muß den Sörensen'schen Phosphatlösungen gegenüber sich in folgender Weise verhalten:

3 sek. + 7 prim. (PH' = 6,47): schwach saure Reaktion
 5 sek. + 5 prim. („ = 6,81): neutrale „
 7 sek. + 3 prim. („ = 7,171): schwach alkal. „

Wenn eine dargestellte Probe Lackmuspapier den Phosphatlösungen gegenüber nicht nach Wunsch reagiert, muß die der Azolitminlösung zugesetzte Natronmenge in entsprechender Weise geändert werden.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1910. 64. 120.

²⁾ Ebenda. 1909. 62. 333.

³⁾ Ebenda. 1909. 60. 1. 1909. 63. 36.

3. Formolmischung. Ist immer frisch herzustellen.

50 ccm käufliches Formol (30–40%ig) wird mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung und danach mit $\frac{1}{5}$ n-Barytlauge oder $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge bis zum ganz schwachen rosa Farbenton vermischt. Sørensen unterscheidet 3 Stadien der Färbung der Kontrolllösung bei dem Titrieren. Zu 20 ccm ausgekochtem, kohlensäurefreiem, destilliertem Wasser — Kontrolllösung — bringt man 10 ccm Formolmischung, dann etwa 5 ccm der $\frac{1}{5}$ n-Barytlauge oder $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge und titriert mit $\frac{1}{5}$ n-Salzsäure zurück, bis ein schwach rosa Farbenton erzielt ist (I. Stadium), man setzt noch einen Tropfen Lauge zu, es entsteht das II. Stadium, eine deutliche rote Färbung; setzt man zwei weitere Tropfen zu, dann entsteht eine stark rote Färbung, das III. Stadium.

Ausführung der Bestimmung.

In einem 100 ccm fassenden Meßkolben werden 50 ccm Harn abpipettiert und mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung (0,5 g Phenolphthalein in 50 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser gelöst) und mit 2 g festem Bariumchlorid versetzt. Nach dem Umschütteln bis zur Lösung des Bariumchlorids werden eine gesättigte Lösung von Bariumhydroxyd* bis zum Eintritte einer roten Farbe und darauf noch 5 ccm zugesetzt, worauf der Kolben bis zur Marke mit Wasser gefüllt wird. Nach gutem Umschütteln wird der Kolben 15 Minuten stehen gelassen, worauf man durch ein trockenes Filter filtriert. 80 ccm des klaren roten Filtrates (40 ccm Harn entsprechend) werden in einen 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht, worauf die Flüssigkeit durch Zusatz von $\frac{1}{5}$ n-Salzsäure und mit empfindlichem Lackmuspapier als Indicator neutralisiert und darauf mit ausgekochtem, kohlensäurefreiem Wasser bis auf 100 ccm verdünnt wird. In gleich großen Teilen der neutralen Flüssigkeit z. B. in 40 ccm = 16 ccm Harn bestimmt man teils das Ammoniak, teils die formoltitrierbare Stickstoffmenge.

Die Ammoniakbestimmung in den 40 ccm wird durch Destillation im Vakuum nach der von M. Krüger und O. Reich angegebenen Anordnung ausgeführt (Seite 68). 1 ccm $\frac{1}{5}$ n-Säure = 0,0028 g N.

Zur Ermittlung der formoltitrierbaren Stickstoffmenge¹⁾ setzt man zu anderen 40 ccm = 16 ccm Harn 10 ccm der Formolmischung (oben) und unmittelbar darauf von der $\frac{1}{5}$ n-Baryt- oder $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge bis zur Rotfärbung und außerdem noch einige ccm der $\frac{1}{5}$ n-Lauge, um etwa noch vorhandene Carbonate oder Phosphate zu fällen. Man titriert darauf mit der $\frac{1}{5}$ n-Salzsäure zurück, bis die Farbe schwächer als die der Kontrolllösung I erscheint (s. oben) und setzt dann Lauge zu, bis die Farbe der Kontrolllösung II erreicht ist, endlich wird weiter titriert, bis die Färbung des III. Stadiums erfolgt ist.

Bei der Ammoniakdestillation erhält man den Ammoniakgehalt in 16 ccm Harn. Multipliziert man die bei der Formoltitrierung verbrauchte Menge $\frac{1}{5}$ n-Lauge in ccm mit 2,8, so erhält man die gesamte Stickstoffmenge

* Anm. S. P. L. Sørensen²⁾ hat nachgewiesen, daß Kohlensäure und Phosphorsäure durch Ausfällen in der angegebenen Weise entfernt sein müssen, wenn zur Formoltitrierung Natronlauge verwendet werden soll. Die anwesenden Phosphate verhindern auch einen scharfen Umschlag beim Titrieren.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1907. 7. 64. 1909. 21. 133. 175; 1909. 22. 355.

²⁾ Ebenda. 1907. 7. 58. 1909. 25. 1.

in mgr ausgedrückt, die in 16 ccm Harn als Ammoniak- und als Aminosäurenstickstoff anwesend ist. Die Differenz zwischen dieser Gesamtstickstoffmenge und der durch die Ammoniakbestimmung gefundenen, als Ammoniak vorhandenen gibt die Menge des Aminosäurenstickstoffes in 16 ccm Harn in mgr an.

B. Die neue Methode, zur Bestimmung von Ammoniak, Hippursäure, Aminosäuren und der peptidgebundenen Stickstoffmenge geeignet.

a) Bestimmung von Ammoniak und Aminosäuren.

Wie oben unter A beschrieben, werden in einem 100 ccm fassenden Meßkolben 50 ccm Harn mit Phenolphthalein, Bariumchlorid und Bariumhydroxyd behandelt und bis zu 100 ccm verdünnt. Aus 80 ccm des klaren roten Filtrates (= 40 ccm Harn) wird das Ammoniak im Vakuum abdestilliert und bestimmt. (Die Ammoniakbestimmung kann auch im Harne direkt vorgenommen werden.) Der Destillationsrückstand wird in dem Kolben in einigen Kubikzentimetern etwa normaler Salzsäure gelöst, worauf unter Evakuierung kohlensäurefreie Luft hindurchgesaugt wird, um Spuren von Kohlensäure auszutreiben. Die salzsaure Lösung wird mit Hilfe von kohlensäurefreiem Wasser in einen 100 ccm fassenden Meßkolben übergeführt, hernach mit empfindlichem Lackmuspapier als Indicator genau neutralisiert (am besten durch Zutropfen von kohlensäurefreier, etwa normaler Natronlauge bis zu schwach roter Farbe und darauf folgender Zusatz von $\frac{1}{5}$ n-Salzsäure bis zur neutralen Reaktion auf Lackmuspapier); schließlich wird mit kohlensäurefreiem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. In einer passenden Menge, z. B. in 40 ccm der neutralen Lösung (= 16 ccm Harn) wird die Formoltitrierung, wie oben angegeben, ausgeführt.

b) Bestimmung von Hippursäure und peptidgebundenem Stickstoff.

50 ccm Harn werden mit etwa 5 ccm ungefähr 5 n-Salzsäure versetzt und darauf 6mal mit Äthylacetat geschüttelt, um die Hippursäure zu extrahieren. Der zum Ausschütteln benutzte Essigäther wird einmal mit Wasser gewaschen und darauf zur Hippursäurebestimmung verwendet, während das Waschwasser mit dem Harne gemischt zur Bestimmung des peptidgebundenen Stickstoffs dient.

Der Essigester wird abdestilliert und der Rückstand 2—3 Stunden mit 50 ccm etwa 30%iger Salzsäure in einem langhalsigen Kjeldahlkolben auf dem Drahtnetze gelinde gekocht. Hiedurch wird die gesamte Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll gespalten; die Stickstoffmenge der letzteren läßt sich dann nach dem Eindampfen der Lösung auf dem Wasserbade und nach Neutralisation mit $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge (Lackmuspapier als Indicator) durch die übliche Formoltitration bestimmen.

Der hippursäurefreie Harn wird mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und in dem gleichen Kolben auf dem Drahtnetze 3 Stunden lang

gelinde gekocht, darauf wird die Lösung auf dem Wasserbade eingeeengt. Der Rückstand wird mit n-Natronlauge und möglichst wenig Wasser in einen 50 ccm fassenden Meßkolben übergeführt und mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung und 2 g festem Bariumchlorid versetzt; schließlich wird mit Wasser oder mit gesättigter Barytlösung bis zur Marke nachgefüllt.

Nach dem Umschütteln und Stehenlassen etwa 15 Minuten lang wird filtriert; vom Filtrate werden 40 ccm (= 40 ccm Harn) in einen 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht; die Lösung wird mit Salzsäure schwach angesäuert, außerdem noch mit 5 ccm n-Salzsäure versetzt und die Flüssigkeit durch Zutropfen von 20 ccm etwa $\frac{1}{3}$ n-Silbernitatlösung entfärbt. Nach dem Auffüllen mit kohlenstoffsaurem Wasser wird filtriert und aus 80 ccm des Filtrates das Ammoniak wie angegeben ausgetrieben. Der Destillationsrückstand wird in Salzsäure gelöst, die Lösung in einen 100 ccm fassenden Meßkolben übergeführt, neutralisiert und wie unter a) bei der Aminosäurebestimmung angegeben behandelt. Zur Formoltitration werden 50 ccm der neutralisierten Lösung (= 16 ccm Harn) verwendet. Die Differenz zwischen dem Aminosäurenstickstoff nach und vor der Salzsäurebehandlung gibt die in 16 ccm Harn vorhandene, peptidgebundene Stickstoffmenge an.

J. Yoshida¹⁾ empfiehlt die Anwendung der Sørensenschen Methode zur Bestimmung der Aminosäuren; das Verfahren ist genau; er kontrollierte es mit Glykokoll. Bei Anwesenheit von Ammoniumsalzen gibt die Methode, wie dies schon de Jager gefunden hatte, etwas zu niedrige Werte. Die Ammoniakbestimmung muß mit der größten Sorgfalt vorgenommen werden. Die Anwendung von Lackmus als Indicator zur Feststellung der wahren Neutralität der Anfangslösung ist ebenso geboten, wie die von Phenolphthalein nach der Formoltitration.

Nach dem Verfasser beträgt der Aminosäurenstickstoff etwa 1% (0,5–2,0%) des Gesamtstickstoffes; die Tagesmenge schwankt zwischen 0,05–0,18 g. Henriques fand für den Aminosäurenstickstoff bei normalen Individuen 2,2% des Gesamtstickstoffes.

H. Malfatti²⁾, der, wie auch A. Ronchèse, die Formoltitration zur Bestimmung des Ammoniaks (S. 70) verwendet hat, fand auf Grund seiner Versuche die Methode von Sørensen und Henriques nicht ganz als einwandfrei. Es war ihm gelungen, in pathologischem Harn eine auf die Gegenwart von Aminosäuren zurückzuführende Differenz zwischen Formoltitration und sonstiger Ammoniakbestimmung festzustellen. Versuche mit Lösungen von Aminosäuren ergaben, daß stärkere Lösungen von Aminosäuren sich mit Formol leicht und gut titrieren lassen, ebenso verdünnte Lösungen nach Zusatz des gleichen Volumens Alkohol. Eine Verdünnung der Stammlösung mit Wasser (10:60) hatte bei Glykokoll keinen namhaften Einfluß auf das Endresultat, nur mußte viel Formol, bis kein weiterer Farbumschlag eintrat, zugegeben werden. 10 mg Glykokoll = 1,7–1,8 mg N. können in 60 ccm Reaktionsflüssigkeit nicht übersehen werden. (Ein verzögertes Auftreten der Endreaktion kann geradezu als Probe auf die Gegenwart von Aminosäuren in größerer Menge in Harnen benutzt werden.) Bei Alanin wurden nur halbwegs befriedigende Resultate erhalten, bei Leucin, Tyrosin und einem Aminosäurengemisch aus Eiweiß waren die Ergebnisse nicht befriedigend. Wurden Harnen nach Schließung oder im Vakuum vom Ammoniak befreit und wurde der filtrierte Rückstand mit Formol titriert, so zeigte es sich, daß in allen normalen Harnen diese Rückstände etwas formoltitrierbare Substanz enthielten (= 2,6 mg N. für 100 g Harn), in pathologischen Harnen bedeutend mehr. Die Resultate sind jedoch ganz unsicher. Nach diesen Versuchen kommen vielleicht in den untersuchten normalen Harnen Aminosäuren, besonders Glykokoll vor, aber jedenfalls nur in recht geringer Menge.

Die Methode ist nach Malfatti nicht einwandfrei, da die Laugenmenge von der Neutralisation auf Lackmus bis zu der auf Phenolphthalein fälschlich den Ergebnissen der Formoltitration zugemessen wird. Es ist auch ein recht mißlicher Umstand, daß die Aminosäuren aus der Differenz der Formoltitration und einer Ammoniakbestimmung berechnet werden müssen. Malfatti versucht daher, die Aminosäuren im Harn direkt mit Formol zu titrieren, nachdem das Ammoniak durch Fällen mit Quecksilberchlorid entfernt wurde. In etwa 50 ccm Harn werden 2–4 g Quecksilberchlorid gelöst, dann wird in kleinen Portionen gepulvertes Natriumcarbonat bis zu eben merklicher alkalischer Reaktion auf Lackmuspapier eingetragen. Die Fällung wird abfiltriert,

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1909. 23. 239.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 61. 499; Zeitschr. analyt. Chem. 1908. 47. 273.

das Filtrat rasch mit einigen Tropfen Eisessig versetzt, das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff entfernt und filtriert; die Kohlensäure und Schwefelwasserstoff werden durch Erwärmen beseitigt; in einer gemessenen Menge des Filtrates wird die Titration mit Formol vorgenommen. Die Methode liefert nach dem Verfasser, auf den Harn angewendet, nicht absolute, aber recht gute Vergleichswerte; ihre Empfindlichkeit kann auf 3—4 mg Glykokollstickstoff geschätzt werden.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß der Harn beim Aufbewahren eine formoltitrierbare und durch Quecksilber nicht fällbare Substanz bildet; ob dieses Glykokoll ist, muß dahingestellt bleiben.

V. Henriques und S. P. L. Sørensen¹⁾ führen diesen Einwänden gegenüber aus, daß beim Neutralisieren Lackmus und beim eigentlichen „Formoltitrieren“ Phenolphthalein als Indikatoren zu verwenden sind; bei allen normalen Harnen leistet die Methode vorzügliche Dienste.

Eine von K. Glässner²⁾ empfohlene quantitative Bestimmung des Aminosäurenstickstoffes beruht darauf, daß sich nach der Behandlung des Harnes mit Phosphorwolframsäure im Filtrate Harnstoff und die Monoaminosäuren vorfinden. Aus dem Rückstande des eingetrockneten Filtrates läßt sich nun mit einer Mischung aus gleichen Teilen wasserfreiem Äthyl- und Amylalkohol der Harnstoff vollkommen in Lösung bringen, die von Glässner geprüften Monoaminosäuren Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure bleiben ungelöst; Tyrosin löst sich in Spuren.

20 ccm Harn fällt man mit der Phosphorwolframsäuremischung (100 g Phosphorwolframsäure Merck in 100 ccm Salzsäure, $D = 1,124$, und 800 ccm Wasser) vollständig aus, filtriert nach 24 Stunden und dampft das Filtrat im Vakuum in einer flachen Schale ein. Nach dem vollständigen Austrocknen des Rückstandes in einem Trockenschranke bei 50° pulvert man den Rückstand, bringt ihn verlustlos in ein Kölbchen und gibt 50 ccm der Alkoholmischung hinzu. Das mit Steigrohr versehene Kölbchen erhitzt man 6 Stunden auf dem kochenden Wasserbade, filtriert dann heiß ab und wäscht das Filter mit der heißen Alkoholmischung aus. Von dem auf dem Filter befindlichen Rückstande bestimmt man den Stickstoff nach Kjeldahl (der Rückstand wird mit 10 ccm konz. Schwefelsäure, 0,5 g Kupfersulfat, 10 g Kaliumsulfat zerstört usw.).

W. Frey und A. Gigon³⁾ nehmen die Bestimmung des Aminosäurenstickstoffes im Harn neben Ammoniak in folgender Weise vor.

20 oder 50 ccm Harn werden in einem hohen schmalen Standgefäß mit 10—20 ccm einer gesättigten Barytlösung und mit 10—15 ccm Alkohol versetzt. Das Ammoniak wird nach K. Spiro (s. Harnstoff) durch einen Luftstrom (2 Stunden lang) abgetrieben, in $\frac{1}{10}$ n-Schwefelsäure aufgefangen und titriert.

Der so behandelte Harn (d. h. nach der Entfernung des Ammoniaks) wird quantitativ in einen Meßkolben gebracht und mit Wasser auf 100 oder 200 ccm aufgefüllt. Nach dem Umschütteln wird filtriert. Vom klaren Filtrate werden 2 Proben von 40 oder 90 ccm entnommen; die erste Probe dient unter Verwendung von alkoholischer Rosolsäurelösung als Indicator zur Bestimmung der für die Neutralisation nötigen Menge $\frac{1}{5}$ n-Salzsäure; der zweiten Probe werden die nun bekannte Menge $\frac{1}{5}$ n-Säure und dann 10 ccm einer 40%igen mit Phenolphthalein und Natronlauge neutralisierten Formollösung hinzugefügt. Die wieder sauer gewordene Flüssigkeit titriert man mit $\frac{1}{5}$ n-Natronlauge (Phenolphthalein) bis zur rotvioletten Farbe. Aus den gebrauchten Kubikzentimetern Lauge läßt sich die Menge des Aminosäurenstickstoffes berechnen.

Die Verf. konnten die Ergebnisse von Sørensen bestätigen. Einfache Lösungen von Ammoniumsulfat, Glykokoll, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Asparaginsäure lassen sich nach der Methode genau titrieren. Tyrosin gibt einen zu hohen Wert.

H. Malfatti⁴⁾ fand zu hohe Aminosäurenwerte, weil die gegen Phenolphthalein ausgeführte Formoltitration des Ammoniaks und der Aminosäuren von Sørensen und Henriques mit dem gegen Lackmus neutralisierten Harn ausgeführt wird, wodurch schwach saure Harnbestandteile als formoltitrierbarer Stickstoff mittitriert werden. Die Formoltitration im Harn muß von der Phenolphthaleinneutralität ausgehen und besser nur bis zum Auftreten der schwachen Phenolphthaleinfärbung fortgeführt werden. Die Differenz zwischen den von der Lackmus- und den von der Phenolphthaleinneutralität ausgehenden Titrationswerten bleibt auch nach Entfernung der Phosphate, Carbonate und des Ammoniaks bestehen, die wohl auf andere Harnbestandteile (Fettsäuren, Phenole) zurückzuführen ist.

Malfatti fand auf Glykokoll bezogen nur etwa 40 mg in 100 ccm Harn, Henriques 0,2%, andere fanden 0,08—0,12%. Nach seiner Ansicht kann die Formoltitration der Aminosäuren im Harn höchstens den Wert einer klinischen Schätzungsmethode beanspruchen; für die Entscheidung wissenschaftlicher Fragen scheint sie bisher noch zu wenig ausgebildet.

L. de Jager⁵⁾ benutzt folgende Methode, die M. W. Scheltema⁶⁾ empfiehlt. 20 ccm Harn werden mit 2 ccm einer 10%igen Kaliumoxalatlösung versetzt und mit $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge (In-

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 63. 27.

²⁾ Zeitschr. exper. Patholog. 1908. 4. 336.

³⁾ Biochem. Zeitschr. 1909. 22. 309.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1910. 66. 152.

⁵⁾ Ebenda. 1909. 62. 333; 1910. 67. 185.

⁶⁾ Pharm. Weekbl. 1915. 1549.

indicator Phenolphthalein) bis zur Rotfärbung titriert (Ac. 1); nun wird 40 ccm neutralisiertes Formalin zugegeben und wieder titriert (Ac. 2). $Ac_2 - Ac_1$ ergeben den Aminosäuren- und Ammoniakstickstoff. Zu weiteren 20 ccm Harn werden 2 ccm Kaliumoxalatlösung und 5 ccm einer Lösung von primärem Magnesiumphosphat, entsprechend 20 ccm $\frac{1}{10}$ n-Lauge hinzugesetzt; nachdem Natronlauge bis zur Rotfärbung zugegeben wurde, werden die Wände des Gefäßes mit einem Glasstabe gerieben; es wird weiter titriert und zwar wird mehr NaOH hinzugefügt, als zur Endreaktion erforderlich ist. Durch Zurücktitrieren mit $\frac{1}{10}$ n-Säure wird die Endreaktion (bis zur sichtbaren Rötung) erreicht; die dazu verbrauchte Menge Lauge ist Ac_3 . Nach Zusatz von 4 ccm Formalin wird wieder titriert, durch abwechselnden Zusatz von NaOH und HCl, bis die Farbe die gleiche ist, wie bei der ersten Bestimmung (Ac_4). $Ac_4 - Ac_3$ ergeben den Aminostickstoffwert; der Ammoniakgehalt muß gleich $(Ac_1 - Ac_2) - (Ac_4 - Ac_3)$ sein. Eine Fehlerquelle liegt darin, daß eine Mischung von Glykokoll und Salmiak bei der Formoltitrierung eine niedrigere Aciditätszunahme zeigt, als die beiden Körper getrennt; ähnliche Verhältnisse liegen auch beim Harne vor. Die angegebene Methode ist empfehlenswert, um sich schnell ein Urteil über den Ammoniakgehalt im Harne zu bilden; der richtige Gehalt muß nach Schlösings Methode kontrolliert werden. Um bei gefärbtem Harne den Farbenumschlag in trüber Flüssigkeit deutlicher hervortreten zu lassen, gibt man zum Harne neben Phenolphthalein ein wenig einer sehr verdünnten Methylengrünlösung zu.

L. de Jager¹⁾ findet, daß die Sörensensche Methode zu hohe Zahlen gibt und daß man besser nach der von Malfatti angegebenen Methode arbeitet.

J. Bang²⁾ hat die Bestimmung des Aminosäurenstickstoffes im Harne nach der Formolmethode dadurch wesentlich erleichtert, daß er durch Schütteln des Harnes mit einer Blutkohle von Merck in Gegenwart von 20%igem Alkohol den Harn vollständig entfärbt, ohne ihm Aminosäuren zu entziehen. Die genuinen Eiweißkörper, die bei der Bestimmung stören, werden von der Kohle bei Gegenwart von Alkohol quantitativ absorbiert. Das Verhalten der Albumosen bliebe noch abzuwarten.

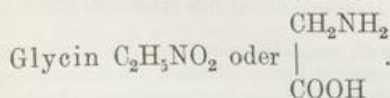
Die Ausführung gestaltet sich folgendermaßen:

50 ccm Harn werden in einem 100 ccm-Meßzylinder mit einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung und etwa 2 g festem Bariumchlorid versetzt. Nach erzielter Lösung bringt man von einer gesättigten Barytlösung soviel hinzu, daß die Flüssigkeit stark rotgefärbt ist. Nun gibt man 20 ccm 95%igen Alkohol in den Meßzylinder und füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf; dann setzt man einen großen Teelöffel voll Blutkohle hinzu und schüttelt tüchtig um. Nach 5 Minuten langem Stehen filtriert man durch ein trockenes Filter in ein trockenes Becherglas; 40 ccm vom Filtrate werden mit 0,5 ccm Phenolphthaleinlösung versetzt (das früher zugesetzte ist von der Kohle adsorbiert), mit $\frac{n}{5}$ Salzsäure neutralisiert, bis die rote Farbe verschwindet und dann weiter, bis ein Tropfen der Flüssigkeit auf Lackmuspapier neutrale Reaktion zeigt. Darauf setzt man etwa das gleiche Volumen neutralisierte Formollösung — Formol des Handels reagiert wegen der Anwesenheit von Ameisensäure immer sauer, man neutralisiert sie mit $\frac{n}{5}$ Lauge, Phenolphthalein als Indikator — hinzu und titriert mit $\frac{n}{5}$ Baryt- oder Natronlauge bis zu dem dritten Stadium.

1 ccm $\frac{n}{5}$ Lauge = 2,8 mg Aminosäurenstickstoff.

Gleichzeitig mit dem Aminosäurenstickstoff wird auch der Ammoniakstickstoff bestimmt; nach der Neutralisation, unter Verwendung von Lackmus, ist alles Ammoniak in Form von Salmiak vorhanden; durch den Formolzusatz wird das Ammoniak in Hexamethylentetramin verwandelt, wobei Salzsäure frei wird; es ist deshalb immer auch eine Ammoniakbestimmung auszuführen, wozu das Filtrat von der Phosphatfällung verwendet werden kann; 40 ccm davon genügen; die Bestimmung nimmt man nach Krüger-Reich oder Folin-Schaffer vor. Durch die Formoltitration wird auch der mit Formol titrierbare Eiweißstickstoff mitbestimmt. Dies spielt jedoch keine Rolle, da der normale Harn nur Spuren von Eiweiß enthält; dagegen muß klinisch nachweisbares Eiweiß aus dem Harne zuerst entfernt werden, ehe die Formoltitration angestellt wird.

A. Glykokoll. α -Aminoessigsäure,



Das Glykokoll wurde im Harne von Gichtkranken vorgefunden (Ignatowski); wie im Eingange erwähnt, soll es auch im normalen Harne vorkommen; die gefundenen Mengen schwanken sehr, so daß es nicht ganz sicher ist, ob es sich wirklich nur um präformiertes Glykokoll handelt. Es bildet

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1910. 67. 185.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 1915. 72. 101.

sich bei der Zersetzung von Harnsäure, Xanthin, Guanin und Adenin, auch Hippursäure kann durch manche Bakterien in Glykokoll und Benzoesäure gespalten werden. A. v. Reuss¹⁾ konnte im Harne von Säuglingen aus den ersten Lebenstagen Glykokoll nachweisen.

Darstellung und Nachweis.

Hierüber wurde im vorhergehenden bei der allgemeinen Besprechung der Aminosäuren eingehender berichtet. Auf weitere Isolierungsverfahren²⁾ (G. Embden und H. Reese, Embden und Marx) kann hier nur hingewiesen werden. Außer der dort erwähnten Methode zum Nachweise des Glykokolls sind noch zu nennen:

1. Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge geht das Glykokoll in Hippursäure über; nach dem Ansäuern kann diese durch Essigäther in Lösung gebracht werden; den Rückstand der Lösung in Essigäther nimmt man mit Chloroform auf, das 5% Benzol enthält; Hippursäure fällt aus, die mit der Lactimidprobe (s. b. Hippursäure) nachgewiesen werden kann.
2. Wird Glykokoll mit Benzolsulfochlorid und Natronlauge geschüttelt, so entsteht nach dem Ansäuern Benzolsulfoglykokoll, das federähnliche, dünne Kristalle bildet; in Wasser schwer löslich.
3. Bei der Einwirkung von Salzsäuregas auf Glykokoll in absolutem Alkohol entsteht der in Wasser und Alkohol sehr leicht lösliche, schön krystallisierende salzsaure Glykokolläthylester, der bei 144° schmilzt und beim Kochen mit Alkali im Überschuß in Glykokoll und Alkohol gespalten wird. (Curtius.)
4. Kupferverbindung, Phenylisocyanatverbindung, s. Eigenschaften.

Eine genaue quantitative Bestimmung gibt es nicht.

Eigenschaften.

Das Glykokoll bildet farblose, harte, rhombische Krystalle oder vierseitige Prismen, besitzt süßen Geschmack und schmilzt bei 232—236° unter Zersetzung; schnell auf 240° erhitzt bildet sich eine purpurrote Flüssigkeit. In kaltem Wasser ist das Glykokoll löslich, schwer in heißem Alkohol, unlöslich ist es in kaltem Alkohol und in Äther. Die wässrige Lösung zeigt saure Reaktion. Mit Metalloxyden und Säuren verbindet sich das Glykokoll; Kupferoxydhydrat (Cuprihydroxyd) wird von siedendem Glykokoll gelöst; nach dem Erkalten und Konzentrieren scheiden sich dunkelblaue Nadeln von Glykokollkupfer aus.

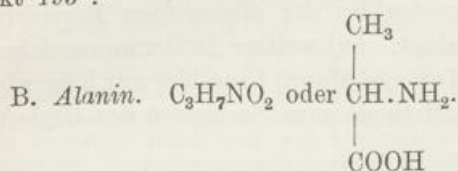
Beim Erhitzen mit Ätzbaryt zerfällt das Glykokoll in Methylamin und in Kohlensäure; durch salpetrige Säure wird es in Glykolsäure, Stickstoff und Wasser zerlegt.

¹⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1909. 22. 158; Zeitschr. f. Kinderheilk. 1911. 3. 286.

²⁾ Beiträge chem. Physiol. Patholog. 1906. 7. 411; 1908. 11. 308.

Durch Bleiessig und Ammoniak wird es gefällt, von Phosphorwolframsäure nur in ganz konz. Lösung.

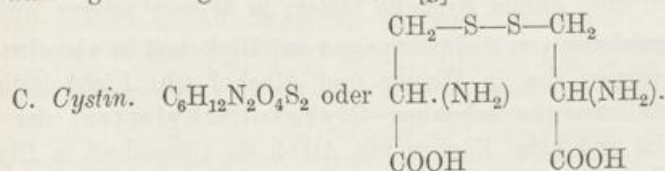
Von Bedeutung sind der schön krystallisierende salzsaure Glykokoll-ester (s. oben), das β -Naphthalinsulfoglykokoll oder -glycin mit dem Schmelzpunkte 156° (korrig. 159°) und die Phenylisocyanatverbindung, Schmelzpunkt 195° .



Alanin, Aminopropionsäure, wurde nur einmal neben Tyrosin, Leucin, Glykokoll, Phenylalanin und Arginin im Harn nach stattgefundener Phosphorvergiftung von J. Wohlgemuth¹⁾ vorgefunden, der auch eine Methode zur Isolierung und Darstellung angegeben hat.

Eigenschaften.

Das Alanin krystallisiert in Nadeln, auch großen rhombischen Krystallen (diese beim langsamen Verdunsten), löst sich leicht in Wasser, schmeckt süß; die wässrige Lösung dreht rechts; $\alpha_{\text{D}}^{20} = +2,70$.



Cystin, α -Diamino- β -dithiodilactylsäure, wird in seltenen Fällen als einziger oder hauptsächlicher Bestandteil von Blasen- und Nierensteinen bei Menschen und Hunden gefunden; seine Hauptbedeutung liegt mehr in der Bildung von Harnkonkrementen als in den Störungen des allgemeinen Befindens. Tritt in einzelnen Fällen Cystin als Hauptbestandteil auf, so scheidet es sich als schwer löslich beim Stehen des Harnes, der zwar in Beziehung auf Farbe, Reaktion und Geruch normale Beschaffenheit zeigen, nicht selten aber einen eigentümlichen Geruch und grüngelbe Farbe aufweisen kann, als krystallinischer Niederschlag von grauweißer Farbe aus.

Im normalen Harn sollen Spuren von Cystin vorkommen.

Mitunter ist der Harn mit Blut vermischt (durch schleimhautreizende Blasensteine bedingt); mit Albuminurie verbindet sich die Cystinausscheidung äußerst selten; bei Cystinurie scheiden sich im Harn in manchen Fällen bestimmte Diamine, die im kranken Organismus entstanden sind, aus; dieselbe Ursache, die die Cystinurie verursacht, ist vielleicht auch die der Ausscheidung von Diaminen, die Diaminurie (s. diese).

Als Begleiter des Cystins können Cadaverin und Putrescin vorkommen, auch Tyrosin und Leucin wurden schon beobachtet, doch sind die genannten

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1905. 44. 74

Diamine für Cystinurie nicht typisch. Es ist eben die Verbrennung der Diaminosäuren Lysin und Arginin eine unvollständige, wodurch die beiden erstgenannten Spaltungsprodukte entstehen können. Am wahrscheinlichsten erscheint es nach Abderhalden, daß die Ausscheidung von Cystin durch eine Störung im Abbau der Proteine im Zellstoffwechsel veranlaßt wird und daß das Auftreten von Cystin hierbei als ein Beweis für die Annahme, daß im intermediären Stoffwechsel Aminosäuren aus Eiweiß gebildet werden, aufgefaßt werden kann. Nach A. Loewy und C. Neuberg¹⁾ handelt es sich um eine Störung des Aminosäurenstoffwechsels im großen Stile. Das Cystin, durch die Hydrolyse des Eiweißes im Darne freigemacht, wird zwar resorbiert, aber nicht wie gewöhnlich in Wasser, Kohlensäure, Ammoniak und Schwefelsäure zersetzt.

Die Ausscheidung des Cystins ist in Beziehung auf die Menge großen Schwankungen unterworfen, kann aber bis 0,5 g und mehr im Tage betragen. Die Cystinurie, die als selbständige Krankheit, aber auch als Begleiterin verschiedener Krankheiten auftreten kann, findet sich beim männlichen Geschlechte häufiger als beim weiblichen und häufiger in der Jugend als im Alter, manchmal bei mehreren Mitgliedern der gleichen Familie. Die Cystinurie kann als eine Familienkrankheit betrachtet werden, sie ist immer chronisch. Sicher ist nach Th. Brugsch die Vererbung bei der durch Cystinurie veranlaßten Stoffwechselstörung. Reichliche Cystinausscheidung hat man nach Phosphorvergiftungen beobachtet. Bei der Fäulnis der Cystin enthaltenden Harn bildet sich als Zersetzungsprodukt des schwefelhaltigen Körpers, der jedenfalls aus dem Eiweißschwefel entsteht, Schwefelwasserstoff.

Das Wesen der Cystinurie in geschichtlicher, chemischer, physiologischer und klinischer Hinsicht hat G. Rosenfeld²⁾ ausführlich besprochen.

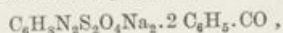
Über Cystinsteine und Cystinsedimente s. unter diesen Namen.

Darstellung, Nachweis und Bestimmung.

1. Hierzu bedient man sich der Methode von E. Baumann und Goldmann.³⁾

Prinzip.

Schüttelt man eine Cystinlösung in Natronlauge mit Benzoylchlorid, so entsteht Benzoylcystin (oder das Natriumsalz des Dibenzoylcystins)



das sich in Äther löst.

Man schüttelt zum Nachweise 1000 ccm Harn mit 10 ccm Benzoylchlorid und 120 ccm 10%iger Natronlauge, bis der Geruch des Benzoylchlorids verschwunden ist, filtriert vom Niederschlage (aus Phosphaten und Verbindungen der Kohlenhydrate bestehend) ab, säuert das Filtrat mit 25%iger Schwefelsäure stark an und schüttelt dreimal mit Äther aus. Den beim Verdunsten des Äthers hinterbleibenden Rückstand, der das Benzoylcystin enthält — dieses krystallisiert

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1904/05. 43. 338.

²⁾ Ergebn. d. Physiolog. 1920. 18. 118. Ber. ges. Physiolog. 6. 228.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1888. 12. 254.

aus Alkohol in feinen, drusenförmigen Nadeln (blumenkohlartig aussehende Massen), die in reinem Zustande bei 180—181° schmelzen —, erwärmt man mit Natronlauge mehrere Stunden auf dem Wasserbade, wobei das Benzoylcystin unter Bildung von Schwefelalkali zersetzt wird, das man mit einigen Tropfen Bleiacetat an der Bildung von Schwefelblei nachweist; auch auf einer Silbermünze kann man diese Reaktion ausführen, indem man etwas von dem Rückstande mit Natronlauge auf der Münze erwärmt (schwarzbrauner Fleck — Schwefelsilber).

2. Auf die Gegenwart von Cystin wird man aufmerksam gemacht, wenn sich im Harnsedimente farblose, sechsseitige Tafeln (s. Abb. Sedimente) vorfinden.

Zur Unterscheidung des Cystins von der Harnsäure unter dem Mikroskope läßt man vorsichtig vom Rande des Deckglases einen Tropfen Ammoniak zufließen; sofort lösen sich die Cystinkrystalle, während Harnsäure ohne Erwärmen sich nicht verändert; nach dem Verdampfen des Ammoniaks krystallisiert das Cystin wieder aus, dessen Ausscheidung durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure zur ammoniakalischen Lösung beschleunigt werden kann; auch durch Salzsäure und Oxalsäurelösung wird das Cystin gelöst, Harnsäure nicht; Cystin gibt die Murexidprobe nicht. Aus Ammoniak krystallisiert das Cystin meist in Tafeln aus (auch ähnlich dem salpetersauren Harnstoff).

Von den Erdphosphaten unterscheidet sich das Cystin dadurch, daß letzteres von Essigsäure nicht gelöst wird; erhitzt man ein Sediment mit Essigsäure, so wird der ungelöst zurückbleibende Teil unter dem Mikroskope die sechsseitigen Tafeln zeigen, die mit Ammoniak und Salzsäure wie angegeben behandelt werden (zur Unterscheidung und Trennung von Harnsäure).

Aus dem konz. Harne (am besten war dieser mit Bleiessig behandelt, das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreit) kann man nach Zusatz von Eisessig im Überschuß und nach 24—48stündigem Stehenlassen Cystin zur Abscheidung bringen. Dies gelingt aber nicht immer.

3. Cystin unter schwachem Erwärmen in Kalilauge gelöst, gibt nach dem Erkalten und Verdünnen mit Wasser auf Zusatz von Nitroprussidnatrium eine violette Färbung (Müller).
4. Cystin verbrennt auf dem Platinbleche mit blaugrüner Farbe und mit Geruch nach Blausäure.

Quantitative Bestimmungen des Cystins.

Ganz genaue Ergebnisse werden mit den empfohlenen Methoden nicht gewonnen.

1. Indirekte Methode.

Man bestimmt nach S. 89 den Gesamtschwefel und die Gesamtschwefelsäure in der Harnprobe. Die Menge des nicht in Form schwefelsaurer und ätherschwefelsaurer Salze vorhandenen Schwefels beträgt sonst ungefähr 17,2%; diese Menge zieht man von dem gefundenen Schwefel ab; der Rest entspricht dem im Cystin vorhandenen Schwefel. Dies Verfahren ist sehr ungenau.

2. Nach v. Udránszky und Baumann¹⁾ neutralisiert man den Ätherrückstand des nach S. 155 gewonnenen Benzoylcystins mit 12%iger Natronlauge, gibt zu dieser Lösung das doppelte Volumen der gleichen Natronlauge und kühlt auf 0° ab. Nach etwa 12—14stündigem Stehen filtriert man das abgeschiedene, in Natronlauge unlösliche Natronsalz des Benzoylcystins — glänzende Blättchen — ab, wäscht dieses mit wenig kalter Natronlauge,

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1891. 15. 88.

löst dann in Wasser (600 ccm) und fällt aus dieser Lösung mit Salzsäure das Cystin, das sich in Form einer Gallerte ausscheidet. Das abgeschiedene Benzoylcystin wird abgesaugt, gewaschen, getrocknet und gewogen.

1 g Cystin = 1,87 Benzoylcystin.

3. Erwärmt man das Benzoylcystin mit Natronlauge und gibt Bleiacetatlösung zu, so scheidet sich Schwefelblei ab (Liebig's Reaktion auf Cystin). Wie Baumann, Suter¹⁾ nachgewiesen haben, geht die Abspaltung des Schwefels und somit die Bildung des Bleisulfides sehr langsam und unvollkommen vor sich und müßte zur vollständigen Abscheidung des Schwefels lange erhitzt werden. Man könnte zweckmäßiger das Benzoylcystin mit Soda und Salpeter verbrennen und durch eine Schwefelsäurebestimmung die vorhandene Menge Schwefel und daraus das Cystin berechnen.

Gef. $\text{BaSO}_4 \cdot 0,5146 = \text{Cystin}$.

P. Borrisow²⁾ hat aus dem Cystin durch Reduktion (Zink und Salzsäure) Cystein hergestellt und dessen Eigenschaft, mit Quecksilberchlorid eine fast unlösliche Verbindung zu geben, für eine quantitative Bestimmungsmethode des Cystins verwenden wollen. Aber auch diese Methode liefert, wie die anderen, ungenaue Zahlen.

4. Methode nach J. F. Gaskell.³⁾

Prinzip.

Die Methode beruht auf der Schwerlöslichkeit des Cystins in Aceton.

Der filtrierte Harn (ein etwa vorhandenes, Cystin enthaltendes Sediment wird zu dem aus dem Harne abgeschiedenen Niederschlage gegeben) — 200 ccm — wird stark ammoniakalisch gemacht und zur Entfernung der Hauptmenge der Oxalate und Phosphate mit Chlorealcium gefällt. Zum Filtrate bringt man das gleiche Volumen Aceton und säuert mit Essigsäure schwach an. Man läßt dann 3—4 Tage stehen, filtriert einen entstandenen Niederschlag ab, gibt hierzu das Sediment, wäscht mit Wasser aus und löst den Filtrerrückstand in $2\frac{1}{2}\%$ igem Ammoniak. Die Lösung wird wieder mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und mit Essigsäure angesäuert. Nach 12—24 stündigem Stehen sammelt man den Niederschlag auf gewogenem Filter, trocknet bei 80° und wägt im Trockengläschen.

Der erhaltene hygroskopische Niederschlag kann beim Umkrystallisieren neben den üblichen hexagonalen Platten in zwei verschiedenen Krystallformen erhalten werden, die in salzsaurer Lösung gleichdrehend sind ($[\alpha]_D = -222^\circ$). In ammoniakalischer Lösung beträgt die spez. Drehung im Mittel $[\alpha]_D = -97,5^\circ$.

Beurteilung.

Der Verf. hat nach dem Ergebnis seiner Versuche 93—96% des dem Harne zugesetzten Cystins wieder gefunden.

Eine colorimetrische Bestimmung des Cystins beschreibt J. M. Looney.⁴⁾

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1895. 20. 504.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1894. 19. 511.

³⁾ Journ. of Physiology. 1907. 36. 142; Chem. Centralbl. 1908. 79. I. 681.

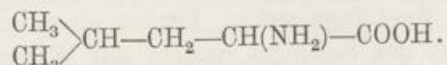
⁴⁾ Journ. Biol. Chem. 1922. 54. 171.

Eigenschaften.

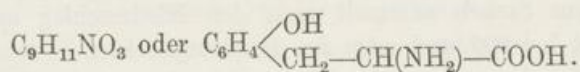
Das im Harn vorhandene l-Cystin — der saure Harn löst 0,05% — krystallisiert in schönen, farblosen, sechsseitigen Täfelchen (s. Sedimente) oder auch in Prismen, ist in Wasser, Alkohol und Äther unlöslich, in Ammoniak und den einfach- und doppeltkohlensaurer Alkalien und Alkalihydroxyden löslich; Lösungen des Cystins drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach links — in schwach salzsaurer Lösung $[\alpha]_D = -214^\circ$ (Baumann) — $-224,3^\circ$ (Moerner) —, doch ist cystinhaltiger Harn nur schwach linksdrehend (einige Minuten), wie der normale Harn. Die ammoniakalische Lösung dreht viel schwächer links. Erhitzt, zersetzt sich das Cystin. Eine salzsaure Lösung des Cystins scheidet, mit einer Auflösung von Kupferacetat im Überschusse versetzt, Cystinkupfer in Form kleiner blauer Kügelchen und himmelblau seidenglänzender Nadeln ab, umgeben von einem bläulich verlaufenden Saume, besonders bei gekreuztem Nicol schön sichtbar; später sind größere Büschel blauer Krystallnadeln zu erkennen. (J. Mauthner.) Beim Behandeln des Cystins mit Zinn und Salzsäure wird es in Cystein übergeführt, das durch die schwächsten Oxydationsmittel wieder in Cystin zurückverwandelt wird.

Cystein gibt in schwach salzsaurer Lösung mit etwas verdünnter Eisenchloridlösung und Ammoniak eine rotviolette Färbung, mit Kupfersulfatlösung eine vorübergehende Violett färbung und dann einen grauen Niederschlag. (Suter.) Das salzsaure Cystein dreht viel schwächer links, wie das Cystin.

D. *Leucin*. α -Aminocapronsäure. α -Aminoisobutyllessigsäure. $C_6H_{13}NO_2$ oder



E. *Tyrosin*, Para-Oxyphenyl- α -Aminopropionsäure. Oxyphenylalanin.



Außer Cystin treten als weitere Aminosäuren im Harn zwei unmittelbare Spaltungsprodukte der Eiweißkörper auf, das Leucin und das Tyrosin.

Beide Stoffe pflegen gewöhnlich gemeinsam im pathologischen Harn vorzukommen und sollen deswegen auch zusammen besprochen werden; eigentlich wäre das Tyrosin erst später bei den Stoffen, die der aromatischen Reihe angehören, zu erwähnen. Im normalen Harn fehlen Leucin und Tyrosin.

G. Pouchet will sie im normalen Harn angetroffen haben, ein einwandfreier Nachweis ist wohl noch nicht erbracht worden oder gelungen.

Sie kommen vor bei starkem rapidem Zerfalle des Lebergewebes, so bei akuter gelber Leberatrophie einhergehend mit einem raschen Eiweißzerfalle und auch bei anderen Leberkrankheiten, bei akuter Phosphorvergiftung (v. Jaksch fand sie hier jedoch selten) bei schwerem Typhus, bei pernicioser

Anämie, Leukämie und anderen Blutkrankheiten; bei Pocken sollen sie ebenfalls im Harn auftreten.

E. Abderhalden fand Tyrosin in einem schweren Falle von Ikterus durch Verschuß des Gallengangs, nach langer Chloroformnarkose, Abderhalden und Schittenhelm konnten die beiden Stoffe in einem Falle bei Cystinurie nachweisen.

Die beiden Stoffe bilden sich also bei raschem Eiweißzerfalle und deuten auf recht erhebliche Störungen des Stoffwechsels hin; sie finden sich im Harn stets in Lösung, doch können sie sich, wohl aber sehr selten, auch im Sedimente abscheiden; Leucin findet sich dann im Sedimente in Form von Kugeln, Tyrosin in Form feinsten Nadelbüschel (s. Sedimente); letzteres pflegt in reichlicherer Menge wie Leucin vorhanden zu sein, es fällt auch als schwerer lösliche Substanz leichter im Sedimente aus. Öfters genügt zur Abscheidung und Kenntlichmachung unterm Mikroskope das langsame Verdunsten eines Tropfens Harn auf dem Objektträger mit etwas Essigsäure.

Darstellung, Bestimmung und Nachweis.

Zum sicheren Nachweise der Stoffe im Harn ist es nötig, sie wenigstens einigermaßen von anderen zu isolieren, da z. B. im Harn vorhandene andere Bestandteile (Oxysäuren) die Hoffmannsche Probe, wie die Chinonprobe ebenso geben, wie im Harn gelöstes Tyrosin.

Wenn zersetzter oder ammoniakhaltiger Harn vorliegt, gelingt die Isolierung manchmal nicht (s. später).

Nach Frerichs, Staedeler, Schotten.¹⁾

Der von Eiweiß befreite Harn (250—500 ccm, oder größere Mengen) wird mit Bleiessig ausgefällt, hierauf wird filtriert, das Filtrat vom Blei durch Schwefelwasserstoff befreit und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft entfernt. Man konzentriert das Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag möglichst stark und zieht den Rückstand zur Entfernung des Harnstoffs mit kleinen Mengen absoluten Alkohols aus; der ungelöst gebliebene Rückstand wird mit schwächerem ammoniakalischem Alkohol ausgezogen, die Flüssigkeit wird eingedampft und der Krystallisation überlassen. Die Entfernung des größten Teiles des Harnstoffes und die der Oxysäuren und Phenole wird auch dadurch erreicht, daß man das auf etwa 50 ccm konzentrierte Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag mit etwas Salzsäure aufkocht, erkalten läßt und 1—2mal mit alkoholhaltigem Äther ausschüttelt. Die wässrige Lösung wird auf dem Wasserbade eingedampft, der sirupartige Rückstand mit 10—20 ccm Wasser aufgenommen und dann der Krystallisation überlassen. Etwa ausgeschiedene Krystalle untersucht man chemisch wie mikroskopisch auf Tyrosin und Leucin.

Bemerkt sei noch, daß man die beiden Körper zweckmäßig durch wenig Alkohol, noch besser (s. unten) durch heißen Eisessig trennen kann, worin sich das Leucin leichter löst, als das Tyrosin. Sollte das Tyrosin stark gefärbt

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1883. 7. 33.

sein, so löst man es in heißem, mit viel Ammoniak versetztem Alkohol, der die färbenden Substanzen löst; beim Konzentrieren der Lösung im Wasserbade scheidet sich das Tyrosin in fast reinen Krystallen aus.

Wären die Krystallisationen oder die Lösungen immer noch unrein, dann hilft man sich in der Weise, daß man die beiden Stoffe in kochendem Wasser nach Zusatz von etwas Ammoniak löst und nun die heiße Lösung nochmals mit Bleiessig fällt, bis keine braune Bleifällung mehr entsteht. Man filtriert, erhitzt das Filtrat und fällt mit Schwefelsäure das Blei aus; es wird sofort heiß filtriert; beim Erkalten scheidet sich dann Tyrosin aus; das Filtrat behandelt man mit Schwefelwasserstoff, konzentriert dieses und kocht es nach Zusatz von frisch gefälltem Kupferoxydhydrat auf. Es kann nun ein Teil des Leucins im Kupferniederschlag, ein anderer im Filtrate sein; den Niederschlag verteilt man in Wasser, zerlegt ihn mit Schwefelwasserstoff und filtriert nach Zusatz von wenig Essigsäure. Das Filtrat, das man noch mit Tierkohle reinigen kann, scheidet nach dem Konzentrieren das Leucin ab; aus der Lösung (dem Filtrate vom Kupferniederschlag) gewinnt man das Leucin, wie eben bei der Behandlung des Niederschlages angegeben.

Durch Umkrystallisieren mit ammoniakhaltigem Alkohol gelingt noch weitere Reinigung.

Vollkommen rein kann man das Leucin bekommen durch Herstellung des Leucinäthylesters nach E. Fischer¹⁾; mit den im Harn vorhandenen Mengen dürfte aber dieser Ester wohl kaum zu erhalten sein.

Wenn die Isolierung nicht gelingt, wenn älterer oder ammoniakhaltiger Urin vorliegt, dann verfährt man in der Weise, daß man nach E. Abderhalden²⁾ den Urin am besten unter vermindertem Drucke bis zur Trockne verdampft und den Rückstand in Wasser löst. Man erhält dann oft sogar aus verdünnten Lösungen leicht die Ausscheidung von Tyrosin und Leucin. Über die Isolierung der Aminosäuren mit Hilfe des Naphthalinsulfochlorids siehe S. 143.

J. Habermann und R. Ehrenfeld³⁾ empfehlen zur quantitativen Bestimmung der beiden Aminosäuren das Erhitzen des Gemisches der beiden isolierten Körper am Rückflußkühler mit einer Mischung von Alkohol und Eisessig. Hierbei geht das Leucin sehr leicht in Lösung, während sich das Tyrosin am Boden des Gefäßes als pulverige Masse ausscheidet, die mit der Saugpumpe abfiltriert werden kann.

Nachweis des Leucins.

1. Eine kleine Probe des möglichst gereinigten Leucins (Umkrystallisieren aus Alkohol) verdampft man vorsichtig auf dem Platinbleche mit Salpetersäure, wobei ein fast ungefärbter und unsichtbarer Rückstand bleibt. Beim Erwärmen des Rückstandes mit etwas Natronlauge löst sich dieser je nach dem Grade seiner Reinheit zu einer gar nicht oder mehr oder weniger gefärbten Flüssigkeit, die sich beim vorsichtigen Erwärmen auf dem Platinbleche über der Flamme zu einem ölartigen, dem Platinbleche nicht adhärierenden herumrollenden Tropfen zusammenzieht [Scherer⁴⁾].
2. Im Reagenzglase über der Flamme erhitzt, sublimiert das Leucin zum Teil in weißen, wolligen Flocken, die sich an der Glaswandung niederschlagen, und unter Entwicklung eines Geruches nach Amylamin.
3. Die Leucinkrystalle lösen sich in Ätzkali, nicht in Äther (Unterschied von Fett, womit sie verwechselt werden könnten).
4. Reaktionen nach Salkowski.
 - a) Eine nicht zu kleine Probe löst man in Wasser, entfärbt, wenn nötig, die Lösung durch etwas reine gutwirkende Tierkohle, filtriert

¹⁾ Berl. Bericht. 1901. 34. 433

²⁾ Brugsch-Schittenhelm, Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden. Berlin-Wien 1908. 566.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1902. 37. 24.

⁴⁾ Journ. prakt. Chem. 1857. 79. 410.

und versetzt das Filtrat mit Natronlauge; zur Lösung gibt man 1—2 Tropfen Kupfersulfatlösung hinzu; das zuerst ausfallende Kupferhydroxyd löst sich unter Bildung von Leucinkupfer zu einer blauen Lösung, die beim Erhitzen nicht reduziert wird.

- b) In ein Reagenzglas bringt man ein etwa 1 cm langes Stückchen Ätzkali (in Stangenform), etwas Leucin und 1—2 Tropfen Wasser. Man erhitzt bis zum Schmelzen des Kalis (Ammoniakentwicklung), löst die erkaltete Schmelze in Wasser und säuert mit verdünnter Schwefelsäure an. Geruch nach Baldriansäure. Leucin spaltet sich unter Sauerstoffaufnahme in Baldriansäure, Ammoniak und Kohlensäure.

Eigenschaften des Leucins.

Das Leucin krystallisiert in farblosen, zarten, perlmutterartig glänzenden Blättchen, in Drusen, oder übereinandergeschichtet; in der unreinen Form im Harne zeigt es mehr oder weniger tingierte Kugeln, die das Aussehen eines großen Fetttropfens haben, von schwach strahliger Beschaffenheit oder Knollen, an denen sich keine krystallinische Kontur wahrnehmen läßt (s. Sedimente).

Leucin löst sich schwer in kaltem Wasser, noch schwerer aber in Alkohol, dagegen leicht in Säuren und Laugen. Unreines Leucin ist leichter löslich. Bei schwachem Erhitzen (170°) sublimiert das Leucin zu wolligen, flockigen Massen unter Verbreitung eines eigentümlichen Geruches (Amylamin). Das natürlich vorkommende Leucin (das l-Leucin) dreht in wässriger Lösung links (2—3%ige Lösung $[\alpha]_D^{20} = -10,35^\circ$), in saurer und alkalischer Lösung rechts (3—5%ige Lösung $[\alpha]_D^{20} = +15,6^\circ$ Fischer und Warburg). Durch salpetrige Säure wird der gesamte Stickstoff frei gemacht. Kennzeichnend sind der Äthylester und das in Wasser sehr schwer lösliche, in blaßblauen Schüppchen krystallisierende Leucinkupfer, beim Kochen von Leucin mit Kupferacetat entstehend; beim Erwärmen von Leucin mit Mercuronitrat wird letzteres in metallisches Quecksilber übergeführt [Hofmeister¹⁾].

Nachweis des Tyrosins.

1. Eine heiß bereitete Tyrosinlösung gibt mit salpetersaurem Quecksilberoxyd und salpetrigsaurem Kalium einen roten Niederschlag, die überstehende Flüssigkeit ist rosen- bis purpurrot (R. Hoffmanns²⁾ Probe).

Man kann die Reaktion auch mit Hilfe von Millons Reagens vornehmen; es entsteht ebenfalls die rote Färbung, wenn man eine kleine Menge Tyrosin im Reagenzglase mit etwas Wasser und einigen Tropfen der Millonschen Lösung kocht (Millons Reagens s. beim Eiweißnachweis). Bei Anwesenheit reichlicher Tyrosinmengen scheiden sich aus der purpurroten Flüssigkeit zahlreiche rote Flocken aus.

2. Eine siedende wässrige Tyrosinlösung färbt sich mit 1%iger Essigsäure, dann tropfenweise mit 1%iger Natriumnitritlösung

¹⁾ Ann. Chem. Pharm. 1877. 139. 6.

²⁾ Ann. Chem. Pharm. 1857. 87. 124.

versetzt, schön rot; mit etwas trockenem Chinon wird die heiße wässrige Tyrosinlösung rubinrot [C. Wurster¹⁾].

3. Man läßt zu 2 ccm reiner Schwefelsäure 3—5 Tropfen reiner Aldehydlösung (5 ccm Acetaldehyd: 10 ccm Weingeist) in einem Reagenzglase tropfenweise und unter beständigem Umschütteln zufließen und fügt von der Tyrosinlösung (in etwas alkalischem Wasser gelöst) hinzu; die Mischung nimmt sogleich eine mehr oder weniger intensive johannisbeerrote Farbe an und zeigt ein breites Absorptionsband in Grün-Gelb [Denigès²⁾].
4. Erhitzt man nach G. Denigès³⁾ 0,02—0,03 Tyrosin mit 4 ccm Eisessig und 4 Tropfen Formol zum Sieden, läßt dann 3 ccm Schwefelsäure zufließen und schüttelt um, so entsteht eine rote Färbung.
5. Erwärmt man trockenes Tyrosin in einem trockenen Reagenzglase mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure etwa $\frac{1}{2}$ Stunde im kochenden Wasserbade, setzt dann Wasser zu und neutralisiert mit Barium- oder Calciumcarbonat, so erhält man ein farbloses Filtrat, das nach dem Konzentrieren in der Kälte auf Zusatz von stark verdünnter säurefreier Eisenchloridlösung schön violett wird [R. Piria⁴⁾].
6. Beim Erhitzen von Tyrosin mit einer Mischung aus 1 Vol. 40%igem Formaldehyd, 45 Vol. Wasser und 55 Vol. konz. Schwefelsäure entsteht sofort oder nach kurzer Zeit eine schöne, lang andauernde Grünfärbung [C. Th. v. Mörners⁵⁾ Probe].
7. Man bringt nach Aloy und Rabaut⁶⁾ zu einer Lösung von Tyrosin in Salzsäure Chlorwasser im Überschuß und dazu Ammoniak; es entsteht eine schön rote Färbung. Bei sehr großer Verdünnung schüttelt man nach dem Zusatze von Chlorwasser mit Äther; bringt man dazu einige Tropfen Ammoniak, so tritt an der Grenzschicht die rote Färbung auf. Empfindliche Probe.
8. Sedimente, Tyrosin krystallisiert enthaltend, werden mit Wasser gewaschen und in Ammoniak unter Zusatz von kohlensaurem Ammonium gelöst; das Filtrat läßt man verdunsten; aus ammoniakalischer Lösung krystallisiert das Tyrosin in Büscheln deutlicher Prismen als Ammoniumverbindung.

Eigenschaften.

Das Tyrosin krystallisiert aus wässriger Lösung in farblosen, seiden-glänzenden, feinen mikroskopischen Krystallnadelchen, die zum Teil garben- oder besenartige Gebilde, Büschel, vorstellen, von denen je zwei Garben in

¹⁾ Zentralbl. Physiol. 1887. 1. 193; 1888. 2. 590.

²⁾ Bull. de la Soc. pharm. de Bordeaux 1901.

³⁾ Bull. Soc. Chim. 1908. [4] 3. 786; Chem. Centralbl. 1908. 79. II. 832.

⁴⁾ Ann. Chem. Pharm. 1852. 82. 251.

⁵⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1902/03. 37. 86.

⁶⁾ Bull. Soc. Chim. 1908 [4] 3. 391; Chem. Centralbl. 1908. 79. I. 1691.

Kreuzform übereinander liegen können (s. Sedimente); sie fließen nie zu Kugeln zusammen (Unterschied von Leucin). Aus ammoniakalischem Alkohol scheidet sich das Tyrosin als Ammoniumsalz in deutlichen büschelförmigen Prismen aus.

In kaltem Wasser und in Alkohol ist das Tyrosin schwer, in Äther ist es unlöslich; leicht löslich ist es in verdünnten Mineralsäuren und kohlensauren Alkalien, auch in ammoniak- oder salzsäurehaltigem Alkohol. Unlöslich ist es in Essigsäure. Auch das Tyrosin gibt wie die meisten Aminosäuren beim Kochen der wässrigen Lösung mit Kupferoxydhydrat ein in blauen Prismen krystallisierendes Kupfersalz (Tyrosinkupfer). Beim Eindampfen mit Salpetersäure entsteht neben Oxalsäure gelbes salpetersaures Nitrotyrosin, das sich mit Kalilauge oder Ammoniak rotbraun bis schwarzbraun färbt (Scherer). Das natürlich vorkommende Tyrosin dreht die Polarisationssebene nach links; die Drehung ist abhängig von der Konzentration der verwendeten Salzsäure, in der das Tyrosin gelöst wird.

Durch Fäulnisbakterien, Fäulnisprozesse im Darm, wird das Tyrosin über die Hydroparakumarsäure, p-Oxyphenylelessigsäure in p-Kresol und schließlich bei Sauerstoffzutritt in Phenol übergeführt.

Als weitere Aminosäuren wurden noch

F. Histidin $C_6H_9N_3O_2$, β -Imidazolyl- α -aminopropionsäure und

G. Arginin $C_6H_{14}N_4O_2$, δ -Guanido- α -aminovaleriansäure

im Harne vorgefunden; ersteres einmal im normalen Harne von R. England¹⁾, letzteres im Harne eines mit Phosphor Vergifteten von J. Wohlgemuth.²⁾ Sie sind für uns ohne besonderes Interesse.

Lysin wurde von D. Ackermann und F. Kutscher³⁾ im Harne eines Cystinurikers nachgewiesen. Sie geben das Verfahren zum Nachweis an.

7. β -Oxybuttersäure. $C_4H_8O_3$ oder $CH_3-CH(OH)-CH_2-COOH$.

Die Säure wurde gleichzeitig von E. Külz⁴⁾ und O. Minkowski⁵⁾ im diabetischen Harne aufgefunden, nachdem vorher Stadelmann⁶⁾ ein Zersetzungsprodukt derselben, die α -Krotonsäure aus solchem Harne erhalten hatte. Sie findet sich im Harne besonders bei schweren Fällen von Diabetes und hier in manchmal großer Menge. Siehe auch Aceton. Dieses reichliche Vorhandensein bei Diabetes mellitus neben Zucker, etwas Eiweiß, Zylindern, neben meist in reichlicher Menge vorhandenen kleinen granulierten Zylindern (Külzsche Zylinder s. d.) gilt dann als Symptom drohender Säureintoxikation oder Acidose (Coma diabeticum). Die Oxydationskraft im Organismus ist herabgesetzt, die β -Oxybuttersäure wird nicht mehr oder nur zum Teil zu Acetessigsäure oxydiert, die Alkalien des Blutes werden gebunden und der

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1908. 57. 49.

²⁾ Ebenda. 1905. 44. 74.

³⁾ Zeitschr. Biolog. 1911. 57. 355.

⁴⁾ Zeitschr. Biolog. 1884. 20. 165.

⁵⁾ Zentralbl. med. Wissensch. 1884. 242; Archiv exp. Pathol. u. Pharmacol. 1884. 18. 35. 147.

⁶⁾ Archiv exp. Pathol. u. Pharmacol. 1883. 17. 419; Archiv klin. Mediz. 1885. 37. 580.