

2. Nach E. Darmstädter.<sup>1)</sup>

## Prinzip.

Beruhrt auf der Zerlegung der  $\beta$ -Oxybuttersäure in Wasser und Krotonsäure durch konzentrierte Mineralsäuren.

## Ausführung.

100 ccm Harn werden nach dem Alkalischemachen mit Soda bis fast zur Trockne eingedampft. Den Rückstand löst man in 150–200 ccm Schwefelsäure (50–55%) und destilliert innerhalb 2–2½ Stunden 300–350 ccm Flüssigkeit ab, indem man aus einem im Destillierkolben befindlichen Scheidetrichter Wasser entsprechend der abdestillierten Menge zufließen läßt. Das Destillat wird 2–3mal mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung verdunstet und der Rückstand auf ca. 160° erhitzt, um allenfalls vorhandene Fettsäuren zu entfernen. Man löst dann in 50 ccm Wasser, filtriert und titriert mit  $\frac{1}{10}$  Natronlauge.

1 ccm  $\frac{1}{10}$  N. NaOH = 0,0086 g Krotonsäure. Oxybuttersäure = 1,21 Krotonsäure.

## Beurteilung.

Die Resultate sollen sehr genau sein.

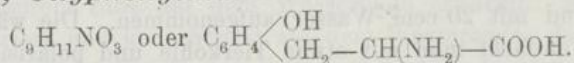
## Eigenschaften.

Farb- und geruchloser Sirup, auch in glashellen plattenförmigen Kristallen kristallisierend, einbasische Säure, dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links; mit Schwefelsäure oder schon mit Wasser erhitzt, bildet sich  $\alpha$ -Krotonsäure; durch Oxydation liefert die Oxybuttersäure Aceton. Die Salze sind leicht löslich in Wasser.

8. *Leucin,  $\alpha$ -Amidocaprönsäure.*  $C_6H_{13}NO_2$  oder

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

9. *Tyrosin, Para-Oxyphenyl- $\alpha$ -Amidopropionsäure, Oxyphenylalanin.*



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

Beide Stoffe pflegen gewöhnlich gemeinsam im patho-

<sup>1)</sup> Zeitschr. physiol. Chem. 1902/03. 37. 355.

logischen Harne vorzukommen; im normalen Harne fehlen dieselben.

Sie kommen vor bei starkem, rapidem Zerfalle des Lebergewebes, so bei akuter gelber Leberatrophie und auch bei anderen Leberkrankheiten, bei akuter Phosphorvergiftung; bei schwerem Typhus, bei Pocken sollen dieselben auch im Harne auftreten.

Was die Entstehung oder Bildung dieser Produkte anbelangt, so finden sich dieselben als Endprodukte der Zersetzung der Eiweißkörper; das Leucin wird aus den Proteinkörpern gebildet und stellt eine Vorstufe des Harnstoffes dar; es ist deshalb mit dem Auftreten des Leucins stets eine Verminderung des Harnstoffgehaltes bemerkt worden. Tyrosin ist ein Produkt der Pankreasverdauung. Beide Stoffe finden sich im Harne stets in Lösung, doch können sie sich, wohl aber sehr selten, auch im Sediment abscheiden; Leucin findet sich dann im Sedimente in Form von Kugeln, Tyrosin in Form feinsten Nadelbüschel (s. Sedimente).

#### Darstellung, Bestimmung und Nachweis.

Zum sicheren Nachweise dieser Stoffe im Harne ist es nötig, dieselben wenigstens einigermaßen von anderen zu isolieren, da z. B. die im Harne vorhandenen anderen Stoffe (Oxysäuren) die Hoffmannsche Probe, wie die Chinonprobe ebenso geben, wie im Harne gelöstes Tyrosin.

Nach Frerichs, Staedeler, Schotten.<sup>1)</sup>

Der eiweißfreigemachte Harn (250—500 ccm, eventuell größere Mengen) wird mit Bleiessig ausgefällt, hierauf filtriert, das Filtrat vom überschüssigen Blei durch Einleiten von 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 Harnstoffes mit kleinen Mengen absoluten Alkohols aus; der ungelöste Rückstand wird mit schwächerem ammoniakalischem Alkohol ausgezogen, die Flüssigkeit eingedampft und der Kristallisation 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 gebrachte Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag mit etwas Salzsäure aufkocht, erkalten

<sup>1)</sup> Zeitschr. physiol. Chem. 1883. 7. 33.

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 zur Kristallisation stehen gelassen. Die eventuell ausgeschiedenen Kristalle untersucht man chemisch wie mikroskopisch auf Tyrosin und Leucin.

Bemerkt sei noch, daß man die beiden Körper zweckmäßig durch wenig Alkohol trennen kann, in welchem sich das Leucin leichter löst als das Tyrosin. Sollte das Tyrosin stark gefärbt sein, so löst man es in heißem, mit viel Ammoniak versetztem Alkohol, welcher die färbenden Substanzen löst; beim Konzentrieren der Lösung im Wasserbade scheidet sich das Tyrosin in fast reinen Kristallen aus.

Wären die Kristallisationen 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 füllt, bis keine braune Bleifällung mehr entsteht. Man filtriert, erhitzt das Filtrat und füllt mit Schwefelsäure das Blei aus; es wird sofort heiß filtriert, beim Erkalten scheidet sich dann Tyrosin aus; das Filtrat behandelt man mit Schwefelwasserstoff, konzentriert und kocht dasselbe nach Zusatz von frisch gefälltem Kupferoxydhydrat auf. Es kann nun ein Teil des Leucins im Kupferniederschlag, ein anderer im Filtrat sein; den Niederschlag verteilt man in Wasser, zerlegt denselben 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 Filtrat vom Kupferniederschlag) gewinnt man das Leucin, wie eben bei der Behandlung des Niederschlages angegeben.

Durch Umkristallisieren mit ammoniakhaltigem Alkohol gelingt noch weitere Reinigung.

Vollkommen rein kann man das Leucin erhalten durch Herstellung des Leucinäthylesters nach E. Fischer<sup>1)</sup>; mit den im Harn vorhandenen Mengen dürfte aber dieser Ester wohl kaum zu erhalten sein.

Habermann und Ehrenfeld<sup>2)</sup> empfehlen zur quantitativen Bestimmung das Erhitzen des Gemisches der beiden isolierten Körper am Rückflußkühler mit einem Alkoholeisessiggemisch. Hierbei geht das Leucin sehr leicht in Lösung, während sich das Tyrosin am Boden des Gefäßes als pulverige Masse ausscheidet, die eventuell mit der Luftpumpe abfiltriert werden kann.

#### Nachweis des Leucins.

1. Eine kleine Probe des möglichst gereinigten Leucins (Umkristallisieren aus Alkohol) verdampft man vor-

<sup>1)</sup> Berl. Ber. 1901. 34. 433.

<sup>2)</sup> Pharm. Centrhl. 1903. 44. 139.

sichtig auf dem Platinbleche mit Salpetersäure, wobei ein fast ungefärbter und unsichtbarer Rückstand bleibt. Beim Erwärmen des Rückstandes löst sich derselbe je nach dem Grade seiner Reinheit zu einer gar nicht oder mehr oder weniger gefärbten Flüssigkeit, die sich beim vorsichtigen Erwärmen auf dem Platinblech über der Flamme zu einem ölartigen dem Platinblech nicht adhärierenden herumrollenden Tropfen zusammenzieht (Scherer).

2. Im Reagenzglase über der Flamme erhitzt, sublimiert das Leucin zum Teil in weißen, wolligen Flocken, die sich an der Glaswandung niederschlagen unter Entwicklung eines Geruches nach Amylamin.
3. Die Leucinkristalle lösen sich in Ätzkali, nicht in Äther (Unterschied von Fett, womit sie verwechselt werden können).

#### Eigenschaften des Leucins.

Das Leucin kristallisiert in farblosen, zarten, 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, in denen sich keine Kontur wahrnehmen läßt (s. Sedimente).

Leucin löst sich schwer in kaltem Wasser, noch schwerer aber in Alkohol, dagegen leicht in Säuren und Laugen. 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, in saurer und alkalischer Lösung rechts. Durch salpetrige Säure wird der gesamte Stickstoff frei gemacht. Charakteristisch ist der Äthylester und das in Wasser sehr schwer lösliche in blaßblauen Schüppchen kristallisierende Leucinkupfer, beim Kochen von Leucin mit Kupferacetat entstehend.

#### Nachweis des Tyrosins.

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

2. Eine siedende wässrige Tyrosinlösung färbt sich mit 1% Essigsäure, dann tropfenweise mit 1% Natriumnitrit versetzt, schön rot; mit etwas trockenem Chinon wird die heiße wässrige Tyrosinlösung rubinrot (Wurster).
3. Man läßt zu 2 ccm reiner Schwefelsäure 3—5 Tropfen reiner Aldehydlösung (5 ccm Acetaldehyd: 10 ccm Weingeist) in einem Reagenzglas 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. (Denigès.<sup>1)</sup>)
4. Erwärmt man Tyrosin mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure ca.  $\frac{1}{2}$  Stunde im Wasserbade, setzt dann Wasser zu und neutralisiert mit Bariumkarbonat, so erhält man ein farbloses Filtrat, das nach dem Konzentrieren in der Kälte auf Zusatz von verdünnter säurefreier Eisenchloridlösung schön violett wird (Piria).
5. Sedimente, Tyrosin kristallisiert enthaltend, werden mit Wasser gewaschen, dann in Ammoniak unter Zusatz von kohlen-saurem Ammon gelöst und das Filtrat verdunsten lassen; aus ammoniakalischer Lösung kristallisiert das Tyrosin in Büscheln deutlicher Prismen als Ammonverbindung.

#### Eigenschaften.

Das Tyrosin kristallisiert aus wässriger Lösung in farblosen, seidenglänzenden, feinen mikroskopischen Kristallnadelchen, die zum Teil garbenartige Gebilde vorstellen, von denen je zwei Garben in Kreuzform übereinander liegen können (s. Sedimente); sie fließen nie zu Kugeln zusammen (Unterschied von Leucin). Aus ammoniakalischem Alkohol scheidet es sich als Ammonsalz in deutlichen büschelförmigen Prismen aus.

In Wasser (kaltem) und Alkohol ist es schwer, in Äther unlöslich; leicht löslich ist es in Säuren und kohlen-sauren Alkalien, auch in ammoniak- oder salzsäurehaltigem Alkohol.

<sup>1)</sup> Bull. de la Soc. pharm. de Bordeaux 1901.

Beim Eindampfen mit Salpetersäure entsteht neben Oxalsäure gelbes salpetersaures Nitrotyrosin, das sich mit Kali oder Ammoniak rotbraun bis schwarzbraun färbt. Das natürlich vorkommende Tyrosin dreht die Polarisationssebene nach links.

#### 10. Der Harnstickstoff.

Der im Harn zur Ausscheidung kommende Stickstoff schließt eine Reihe verschiedener Stoffe ein, die man wohl gemeinlich mit dem Namen „stickstoffhaltige Endprodukte“ zu bezeichnen gewohnt ist. Als solche sind zu nennen der Harnstoff, die Harnsäure, das Kreatinin, die Purinbasen, das Ammoniak, sowie einige erst seit neuerer Zeit bekannt gewordene Stoffe, die Oxyproteinsäure und die Alloxypoteinsäure. Von diesen genannten Stoffen ist allerdings der Harnstoff diejenige Stickstoffverbindung, die in weitest reichlichster Menge vorkommt und infolge dessen auch als das wichtigste stickstoffhaltige Endprodukt der Zersetzung von Eiweißstoffen im Organismus zu betrachten ist, da ca. 84 bis 86% des Stickstoffes als Harnstoff den Organismus im Harn verlassen, während die übrigen Prozente auf die genannten anderen stickstoffhaltigen Endprodukte des Stoffwechsels entfallen, davon 3% auf vorhandenes Ammoniak.

Von Gesunden werden in der Tagesmenge Harn ca. 11 bis 15 g Stickstoff ausgeschieden.

Es ist selbstverständlich, daß die Kenntnis des ausgeschiedenen Stickstoffes zur Berechnung und Bestimmung des Eiweißumsatzes und des Nutzungs- und Nährwertes einer Nahrung von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist. Hierzu ist zu erwähnen, daß der größte Teil des zur Ausscheidung kommenden Stickstoffes allerdings durch den Harn erfolgt, daß aber auch die Untersuchung des Kotes für eine richtige Berechnung nach der angedeuteten Richtung hin noch berücksichtigt werden muß, da in diesem die nicht zur Resorption gekommenen Eiweißstoffe und deren Umwandlungsprodukte enthalten sind. Vom gesunden Organismus wird die gleiche Menge Eiweiß, als zur Resorption gelangt, im Körper zersetzt und kommt im Harn und Kot zur Ausscheidung.

Unter pathologischen Fällen, bei Diarrhöen, Fieber, Schweiß, Erkrankung der Nieren und des Herzens erscheint nicht aller Stickstoff im Harn; bei Resorption von stickstoff-