

Über den Nachweis organischer Basen im Harn.

Von

R. Engeland.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. Juli 1903.)

In einer Reihe von Arbeiten ist in dieser Zeitschrift von Lohmann und Kutscher, Kutscher und Achelis gezeigt, daß im Harn eine Anzahl organischer Basen stecken, die bisher der Beobachtung entgangen waren. Ich habe diese Untersuchungen mit Methoden fortgesetzt, die von den genannten Forschern nicht angewandt wurden, und möchte im folgenden über meine Ergebnisse berichten.

I. Fällung des Harns mit kaltgesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung.

Nach dem von Johnson¹⁾ angegebenen Verfahren wurden etwa 24 Liter normaler menschlicher Harn mit einer kaltgesättigten Lösung von Quecksilberchlorid und einer ebensolchen von Natriumacetat versetzt. Schon Huppert²⁾ fand, daß mit dieser Methode ein Ende der Fällung nicht zu erreichen ist, sondern daß eine Probe der filtrierten Flüssigkeit mit einem Überschuß von Quecksilberchloridlösung immer wieder einen Niederschlag absetzt. Ich kann diese Wahrnehmung bestätigen. Ich gab also so lange von den Fällungsmitteln zu, als auf unmittelbaren Zusatz derselben noch ein Niederschlag entstand. Nach mehrtägigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt und mit einem Gemisch von gesättigter, wässriger Quecksilberchlorid-

¹⁾ Proceedings of the London Roy. Society, Bd. XLII, S. 865; Bd. XLIII, S. 493. Chem. News, Bd. LV, S. 304.

²⁾ Analyse des Harns von Huppert, 3. Auflage, Wiesbaden 1898, S. 397.

und Natriumacetatlösung gut gewaschen. Dann wurde der Niederschlag in verdünnte heiße Salzsäure gebracht und längere Zeit damit auf dem Wasserbade digeriert. Hierbei ging der größte Teil mit dunkelbrauner Farbe in Lösung, während sich das Unlösliche klar absetzte. Von ihm wurde dekantiert und schließlich abgesaugt. Das Filtrat wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Vom ausgeschiedenen Schwefelquecksilber wurde abgesaugt und das Filtrat auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Krystallisation eingengt. Dann wurde erkalten gelassen, wobei die Masse krystallinisch erstarrte. Darauf wurde mit Methylalkohol aufgenommen; ein Teil blieb ungelöst auf dem Filter. Er bestand nur aus anorganischen Salzen. Das Filtrat wurde abgedampft, der Rückstand mit heißem Wasser aufgenommen und durch Aufkochen mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Das Filtrat wurde bis zur beginnenden Krystallisation eingengt und dann erkalten gelassen. Hierauf wurde mit absolutem Äthylalkohol aufgenommen. Hierbei verblieb ein erheblicher Teil ungelöst, der vorwiegend aus Kreatinin- und Ammoniumchlorid bestand. Das Filtrat hiervon wurde zum Sirup eingengt, mit wenig absolutem Alkohol aufgenommen und mit alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Dann wurde er in heißem Wasser gelöst und mittels Schwefelwasserstoff vom Platin befreit. Das Filtrat vom Platinsulfid wurde zum dünnen Sirup eingengt und mit 30 %iger Goldchloridlösung versetzt. Es fiel sofort ein Goldsalz krystallinisch aus. Dasselbe erwies sich als das nicht ganz reine Golddoppelsalz des Kreatinins. Es ergab folgende Analysenwerte:

0,1400 g Substanz gaben 0,0560 g CO₂ und 0,0258 g H₂O.
 0,0918 „ „ „ 0,0404 „ Au.

Für C₄H₇N₃O · HCl · AuCl₄

Berechnet:	Gefunden:
Au = 43,5 %	Au = 44,0 %
C = 10,9 %	C = 10,9 %
H = 2,3 %	H = 2,1 %

Das Filtrat der Platinfällung wurde abgedampft, mit heißem Wasser aufgenommen und mittels Schwefelwasserstoff vom

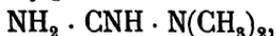
Platin befreit. Vom ausgeschiedenen Platinsulfid wurde abfiltriert, zum Sirup eingengt und mit 30 %iger Goldchloridlösung versetzt. Nach längerem Stehen krystallisierte ein Goldsalz in großen gelben Tafeln aus. Es war das Golddoppelsalz des Dimethylguanidins. Durch Umkrystallisieren aus heißer konzentrierter Salzsäure konnte es leicht rein gewonnen werden. Die Analyse ergab folgende Werte:

0,1074 g Substanz gaben	0,0494 g Au.
0,1084 » » »	0,0500 » »
0,1232 » » »	0,0282 » H ₂ O und 0,0380 g CO ₂ .
0,1012 » » »	8,7 ccm N; T. = 14°; Ba = 750.

Für C₉H₆N₃ · HCl · AuCl₃

Berechnet:	Gefunden:	
	I. Umkrystallisation	II. Umkrystallisation
Au = 46,2 %	Au = 46,0 %	46,1 %
C = 8,4 %	C = —	8,4 %
H = 2,4 %	H = —	2,6 %
N = 9,8 %	N = —	10,1 %

Das Goldsalz schießt, wie oben bemerkt, beim langsamen Auskrystallisieren in großen gelben Tafeln an. Beim schnellen Auskrystallisieren erscheint es in glänzenden schuppenförmigen Blättchen. Das Salz schmilzt bei 144° und zersetzt sich etwa bei 150°. Es handelt sich demnach hier zweifellos um das asymmetrische Dimethylguanidin von der Struktur



denn das Aurat des von M. Schenck¹⁾ beschriebenen synthetischen symmetrischen Dimethylguanidins schmilzt bei 122°. Auch im Hundeharn scheint das Dimethylguanidin als normaler Bestandteil aufzutreten; wenigstens wurden gelegentlich eines Fütterungsversuchs aus 2 Liter Hundeharn 0,15 g der Goldverbindung isoliert.

Mit dem weiter unten zu schildernden Verfahren vermochte ich kein Dimethylguanidinaurat zu gewinnen. Ich glaube dies darauf zurückführen zu müssen, daß dasselbe nur aus annähernd reinen Lösungen willig auskrystallisiert, aus unreinen dagegen

¹⁾ Martin Schenck, Über methylierte Guanidine und einige andere Guanidinderivate, Inauguraldissertation, Marburg 1907.

nur sehr zögernd. Bei dem oben geschilderten Verfahren, also bei der Fällung in relativ verdünnten Lösungen, enthielt der Niederschlag nur eine ganz beschränkte Anzahl von Substanzen, ich konnte also mit einigermaßen reinen Lösungen arbeiten; bei den unten geschilderten Verfahren fällte ich dagegen stark eingeengten Harn mit konzentrierteren Fällungsmitteln. Die Fällung war daher umfassender, und die das Dimethylguanidin enthaltende Fraktion enthielt so viel verschiedenartige Substanzen, daß das Auskrystallisieren des Dimethylguanidinaurats völlig hintangehalten wurde. Jedenfalls ist durch meine Versuche jetzt endgültig nachgewiesen, daß im Harn die unmittelbare Vorstufe des Kreatinins, das Dimethylguanidin, auftreten kann.

II. Fällung des Harns nach vorheriger Konzentration und Reinigung mit Tannin.

Etwa 28 Liter Harn wurden auf freiem Feuer auf $\frac{1}{3}$ des Volumens eingedampft. Dann wurde bei ganz schwach saurer Reaktion mit (20 %) Tanninlösung ausgefällt. Die Fällung setzt sich gut ab, wenn man genügend Tanninlösung zugegeben hat, sodaß man die überstehende Flüssigkeit klar abgießen kann. Es wurde also von der Tanninfällung dekantiert und das Dekantat nach bekanntem Verfahren mit Barytwasser vom überschüssigen Tannin, mit Schwefelsäure vom Baryt und mit Bleioxyd von der Schwefelsäure sowie den Resten des Tannins befreit. Die resultierende, dunkel gefärbte Flüssigkeit wurde mit heißer gesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung ausgefällt. Wenn die Fällung beendet ist, darf eine Probe der filtrierten Flüssigkeit mit einem Überschuß von kaltgesättigter Quecksilberchloridlösung auch nach längerem Stehen keinen Niederschlag mehr absetzen. Nach einigem Stehen wurde die Fällung abgesaugt und mit kaltgesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung gewaschen. Dann wurde der Niederschlag mit heißer verdünnter Salzsäure digeriert, vom Unlöslichen dekantiert und schließlich abgesaugt. Das Filtrat wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand mit Methyl-

alkohol aufgenommen. Hierbei blieben die anorganischen Beimengungen ungelöst zurück. Von ihnen wurde abfiltriert, das Filtrat abgedampft, der Rückstand mit heißem Wasser aufgenommen und durch Kochen mit Tierkohle¹⁾ energisch entfärbt. Die geklärte Flüssigkeit wurde zum Sirup eingeeengt und mit Äthylalkohol aufgenommen, hierbei blieben Ammonium- und Kreatininchlorid ungelöst zurück. Von ihnen wurde abfiltriert und das Filtrat aufs neue zum Sirup eingeeengt und mit absolutem Alkohol aufgenommen.

Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis eine in kaltem absolutem Alkohol leicht lösliche Masse resultierte. Dann wurde die konzentrierte wässrige Lösung mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Es trat eine reichliche krystallinische Fällung auf. Diese bestand aus reinem Methylguanidinaurat. Dasselbe wurde abgesaugt und aus heißer verdünnter Salzsäure umkrystallisiert. Das Salz schmolz bei 198°.

Die Analyse ergab:

0,1228 g Substanz gaben	0,0586 g Au	
0,1029 » » »	0,0491 » »	(nach Umkrystallisation)
	Für $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$	

Berechnet:

$$Au = 47,7\%$$

Gefunden:

$$Au = 47,7\%; 47,7\%$$

Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug ca. 2,1 g.

Diese Methode scheint die einfachste und damit die geeignetste, um aus relativ geringen Mengen Harn das Methylguanidin zu isolieren. Es könnte nun in betreff des Methyl- und Dimethylguanidins das Bedenken geltend gemacht werden, daß dieselben durch das anhaltende Abdampfen mit Salzsäure aus dem ja in großer Menge vorhandenen Kreatinin hervorgegangen sein könnten. Um dies zu prüfen, stellte ich 1,802 g analysenreines Kreatingoldchlorid dar. Davon gaben 0,1057 g Substanz 0,0460 g Au = 43,5%. Berechnet sind 43,5% Au.

Aus der Goldverbindung setzte ich mittels Schwefelwasserstoff das Chlorid in Freiheit und rauchte dasselbe etwa 10 mal

¹⁾ Die Knochenkohle «Kahlbaum» ist nicht brauchbar, da sie noch Calciumsulfat enthält. Besser ist die reine Tierkohle von Merck, doch muß man auch diese vor dem Gebrauch durch Auskochen mit verdünnter Salzsäure reinigen.

mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade ab. Den Rückstand extrahierte ich mit absolutem Alkohol. Hatten sich Methyl- oder Dimethylguanidin gebildet, so mußten sie in diesen alkoholischen Extrakt gehen, da ja ihre Chloride in absolutem Alkohol sehr viel leichter löslich sind als Kreatininchlorid. Es hätte also der in Alkohol lösliche Teil als Goldverbindung einen höheren Goldgehalt haben müssen als der Rückstand.

Ich dampfte den alkoholischen Extrakt ab und führte denselben durch Zusatz von 30%iger Goldchloridlösung in die Goldverbindung über. Weiter stellte ich aus dem unlöslichen Rückstand die Goldverbindung her. Die Analyse beider Goldsubstanzen ergab folgende Zahlen: ¹⁾

I. Für den alkoholischen Extrakt.

0,1216 g Substanz gaben 0,0525 g Au.

II. Für den Rückstand.

0,1165 g Substanz gaben 0,0509 g Au.

Berechnet für $C_4H_7N_3O \cdot HCl \cdot AuCl_3$:

Gefunden:

	alkoholischer Extrakt	Rückstand
Au = 43,5%	43,2%	43,7%

Beide Teile zeigen also gleiche Zusammensetzung und der Goldwert des Kreatinins ist derselbe geblieben; ein Zeichen, daß es keine Veränderung erlitten hat.

In einem anderen Falle rauchte ich eine größere Menge Kreatininchlorid (etwa 10 g) wiederholt mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade ab. Das Kreatininchlorid war aus reinem Kreatin gewonnen. Auch hier kam ich zu dem gleichen Resultat. Alkoholischer Extrakt und Rückstand lieferten Goldsalze von gleichem Goldgehalt, während bei so großen Mengen von Kreatininchlorid zweifellos eine bedeutende Differenz zutage getreten wäre, wenn sich auch nur relativ geringe Mengen von Abbauprodukten gebildet hätten. Ich lasse hier die gefundenen Analysenwerte folgen:

¹⁾ Bei der Darstellung des Kreatiningoldchlorids soll man das Kreatininchlorid in möglichst wenig konzentrierter HCl lösen und mit 30%iger Goldchloridlösung fällen. Die Kreatiningoldverbindung ist in konzentrierter Salzsäure schwer löslich. Sie läßt sich damit ohne starken Verlust waschen. Auch das Methylguanidin- und Dimethylguanidinaurat sind in konzentrierter Salzsäure schwer löslich.

I. Vom alkoholischen Extrakt.

0,0964 g Substanz gaben 0,0421 g Au.

II. Vom Rückstand.

0,1327 g Substanz gaben 0,578 g Au.

Berechnet für $C_4H_7N_3O \cdot HCl \cdot AuCl_3$:

Gefunden:

	alkoholischer Extrakt	Rückstand
Au = 43,5 %	43,7 %	43,6 %

Damit ist wohl zur Genüge dargetan, daß sowohl Methyl- als auch Dimethylguanidin in der Tat präformiert im Harn vorhanden sind. Auf die Bestandteile der Tanninfällung werde ich in einer späteren Arbeit eingehen.

III. Unmittelbare Fällung des Harnes mit heiß gesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung.

Etwa 40 Liter menschlicher Harn wurden unmittelbar abwechselnd mit heiß gesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung so lange versetzt, bis eine filtrierte Probe der Flüssigkeit mit einem Überschuß der kalt gesättigten Fällungsmittel auch beim Stehen keine Trübung mehr gab. Nach mehrtägigem Stehen setzte sich der Niederschlag klar ab, sodaß von ihm dekantiert werden konnte. Schließlich wurde er abgesaugt und mit einer Mischung von kalt gesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung gewaschen. Dann wurde die Fällung mit heißer verdünnter Salzsäure digeriert, vom Unlöslichen erst dekantiert und dann abgesaugt. Das dunkelbraun gefärbte Filtrat wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Vom ausgeschiedenen Schwefelquecksilber wurde abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Krystallisation eingeeengt, dann erkaltengelassen und mit Methylalkohol aufgenommen, vom Unlöslichen (anorganisch) wurde abfiltriert und die methylalkoholische Lösung zum Sirup eingeeengt. Dieser wurde mit heißem Wasser aufgenommen und durch Kochen mit Tierkohle energisch entfärbt. Die geklärte Flüssigkeit wurde zum dünnen Sirup eingeeengt, wobei reichliche Krystallisation auftrat. Dann wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen. Hierbei blieb fast alles Kreatinin ungelöst zurück. Es ließ sich durch Aufnehmen mit Methylalkohol von anorga-

nischen Beimengungen befreien und durch Umkrystallisation aus heißem verdünntem Äthylalkohol rein gewinnen:

0,1120 g Substanz gaben 0,1088 g AgCl.

Für $C_4H_7N_3O \cdot HCl$

Berechnet:	Gefunden:
Cl = 23,8 %	24,0 %

Ich bemerke, daß das Filtrat der Quecksilberfällung, vom Quecksilber befreit, nicht mehr die Weylsche Reaktion gibt. Es scheint also auch in unverdünntem Harn das Kreatinin durch heißgesättigte Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung so gut wie quantitativ abgeschieden zu werden.

Das Filtrat vom Kreatininchlorid wurde abgedampft und aufs neue mit absolutem Alkohol aufgenommen. Dies wurde so oft wiederholt, bis die Masse sich auch in kaltem absolutem Alkohol leicht löste. Das Ammonium- und Kreatininchlorid ließen sich auf diese Weise fast vollkommen beseitigen. Schließlich wurde die Masse mit alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. Der Niederschlag setzte sich schmierig zusammen, so daß die überstehende Flüssigkeit klar dekantiert werden konnte. Die Fällung wurde mit absolutem Alkohol gewaschen und in heißem Wasser gelöst; vom schwer löslichen Ammoniumplatinat wurde abfiltriert und das Filtrat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Platin befreit. Das Filtrat vom Platinsulfid wurde zum dünnen Sirup eingeengt und mit 30 %iger Goldchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen unter dem Exsikkator krystallisierte allmählich ein Goldsalz aus. Dasselbe wurde abgesaugt und aus heißer verdünnter Salzsäure umkrystallisiert.

Hierbei trat starke Reduktion auf, die auch nach mehrmaligem Umkrystallisieren nicht verschwand. Um daher das Salz frei von reduziertem Golde zu bekommen, löste ich es in wenig konzentrierter heißer Salzsäure und filtrierte in eine mit Eis gekühlte Saugflasche, in der das Salz denn auch sofort ohne Reduktion auskrystallisierte. Leider reichte das durch das komplizierte Reinigungsverfahren stark verminderte Material nicht mehr zu einer vollständigen Analyse aus. Die gefundenen Analysenwerte stimmen gut zu dem Aurat des Vitiatins, das bekanntlich schon früher als Bestandteil des normalen Harns nachgewiesen wurde.

0,1120 g Substanz gaben 0,0526 g Au.

0,1050 g Substanz gaben 8,7 ccm N; T. = 11°; Ba = 760 mm.

Für $C_8H_{14}N_8 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$

Berechnet:

Au = 47,0 %

N = 10,0 %

Gefunden:

Au = 47,0 %

N = 10,0 %

Aus der Mutterlauge dieses Goldsalzes krystallisierte nach wochenlangem Stehen unter dem Exsikkator eine weitere Goldverbindung aus in rotgelben Oktaedern. Die ganze Masse erstarrte schließlich zu einem Krystallbrei. Das Salz wurde abgeseigt und aus verdünnter Salzsäure umkrystallisiert. Es war darin sowie auch im Wasser sehr leicht löslich. Auch die aus dem Goldsalz regenerierte Platinverbindung war nur in absolutem Alkohol schwer löslich. Ich benutzte daher zur Isolation dieses Körpers doch die Goldverbindung. Dieselbe wurde durch Umkrystallisation aus heißer konzentrierter Salzsäure gereinigt. Ich ließ das Salz langsam bei gewöhnlicher Temperatur auskrystallisieren, wobei es sich in Warzen zusammensetzte. Das Salz ist hygroskopisch; beim Erwärmen auf 100° schwärzt es sich, beim stärkeren Erhitzen färbt es sich mehr und mehr dunkel und zersetzt sich langsam unter starkem Aufblähen. Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug 0,5 g der Goldverbindung; doch war dies jedenfalls nur ein kleiner Teil der in Wirklichkeit vorhandenen Substanzmenge, da bei der Leichtlöslichkeit des Goldsalzes der größte Teil beim Umkrystallisieren in den Mutterlauen blieb.

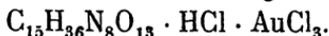
Die Analyse der bei 60° getrockneten Substanz ergab:

0,1197 g Substanz gaben 0,0882 g CO_2 und 0,0439 g H_2O .

0,1009 „ „ „ 11,2 ccm N; T. = 13°; Ba = 743 mm.

0,1197 „ „ „ 0,0268 g Au.

Die gefundenen Werte stimmen gut zu der Formel



Für $C_{15}H_{36}N_8O_{13} \cdot HCl \cdot AuCl_3$

Berechnet:

C = 20,5 %

H = 4,3 %

N = 12,8 %

Au = 22,5 %

Gefunden:

C = 20,1 %

H = 4,1 %

N = 13,0 %

Au = 22,4 %

Die verdoppelte Formel dieses Körpers hat bis auf den Sauerstoffgehalt eine nicht zu verkennende Ähnlichkeit mit der

für die Protamine angegeben; so namentlich mit der des Scombrins, für die angegeben wird $C_{30}H_{70}N_{16}O_6$, die verdoppelte Formel unseres Körpers lautet: $C_{30}H_{72}N_{16}O_{26}$.

Daß es sich in der Tat um einen dem Eiweiß nahestehenden Körper handelt, zeigen seine Reaktionen. Das aus dem Goldsalz mittels Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzte Chlorid gibt mit Natronlauge und einigen Tropfen Kupfervitriol erwärmt starke Biuretreaktion. Mit einer Auflösung von Diazobenzolsulfosäure in Natriumcarbonat gibt es eine intensiv dunkelrote Verfärbung. Mit Bromwasser erwärmt gibt es nach anfänglicher Entfärbung eine sich allmählich verstärkende tief weinrote Farbe.¹⁾ Die Millonsche Reaktion fiel negativ aus. Es handelt sich also jedenfalls um ein hoch molekulares Sprengstück des Eiweißes, mit einem beträchtlichen Gehalt an Histidin.

Der Gehalt an Histidin ist nicht erstaunlich, da es mir gelang, aus dem Filtrat der Platinfällung auch freies Histidin zu isolieren.

Das Filtrat der Platinfällung wurde abgedampft, der Rückstand mit heißem Wasser aufgenommen, mittels Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, das Filtrat zum Sirup eingeeengt und mit 30 %iger Goldchloridlösung versetzt. Nach längerem Stehen unter dem Exsikkator krystallisierte langsam ein Goldsalz aus. Dasselbe wurde abgesaugt und durch Umkrystallisieren aus heißer konzentrierter Salzsäure gereinigt. Schmelzpunkt und Analyse zeigten, daß es sich um Methylguanidinaurat handelte. Ich lasse die gefundenen Werte folgen:

0,1205 g Substanz	gaben	0,0573 g Au.
0,1205 »	»	0,0260 » CO_2 und 0,0245 g H_2O .
0,1123 »	»	9,75 ccm N; T. = 12°: Ba = 746.

Für $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$

Berechnet:	Gefunden:
C = 5,8 %	C = 5,9 %
H = 2,0 %	H = 2,3 %
N = 10,2 %	N = 10,2 %
Au = 47,7 %	Au = 47,6 %

Das Salz schmolz bei 196°.

¹⁾ Siehe Knoop, Hofmeisters Beiträge, Bd. XI, S. 356.

Die Mutterlauge des Methylguanidinaurats wurde mit Schwefelwasserstoff vom Gold befreit, vom Schwefelgold filtriert und zum dünnen Sirup eingeengt. Dann wurde mit wenig absolutem Alkohol aufgenommen und in der Wärme mit heißer, gesättigter, alkoholischer Cadmiumchloridlösung ausgefällt. Durch Eintragen von feingepulvertem Cadmiumchlorid wurde dafür Sorge getragen, daß sich die Flüssigkeit vollkommen mit dem Fällungsmittel sättigte. Die voluminöse Fällung wurde abgesaugt und mit alkoholischer Cadmiumchloridlösung gewaschen. Ich nenne diese Fällung Cadmiumfällung I. Sie wurde in heißem Wasser gelöst, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Cadmium befreit und das Filtrat vom Cadmiumsulfid zum dünnen Sirup eingeengt. Das Filtrat von Cadmiumfällung I ergab auf Zusatz von alkoholischer Natriumacetatlösung eine weitere reichliche Fällung. Sie wurde abgesaugt und mit einem Gemisch von konzentrierter alkoholischer Cadmiumchlorid- und Natriumacetatlösung gewaschen. Sie heiße Cadmiumfällung II.

Sie wurde genau wie Fällung I behandelt. Die aus ihr gewonnene Lösung der Chloride gab mit Gold- und Platinchlorid keinen nennenswerten Niederschlag. Dagegen gaben sowohl die aus Fällung II wie auch aus Fällung I gewonnenen Chloride eine äußerst intensive Diazo- und mit Natronlauge und Kupfervitriol erwärmt die Biuretreaktion und verrieten damit die Anwesenheit von Histidin. Um dasselbe zu isolieren, verfuhr ich folgendermaßen: Ich vereinigte beide Teile und dampfte sie zwecks Austreiben der überschüssigen Salzsäure mehrmals mit Alkohol ab. Dann wurde das Chlor mittels Silbernitratlösung beseitigt, vom ausgeschiedenen Chlorsilber abfiltriert und das Filtrat mit Silbernitratlösung versetzt, bis eine Probe der Flüssigkeit mit Barythydratlösung einen braunen Niederschlag gab. Hierauf wurde mit Ammoniak versetzt, bis eine Probe sich mit ammoniakalischer Silberoxydlösung nicht mehr trübte. Die entstandene Fällung wurde abgesaugt und mit Wasser sorgfältig gewaschen. Dann wurde sie mit heißer verdünnter Salzsäure zersetzt. Vom Chlorsilber wurde abgesaugt und das Filtrat mehrmals mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade abgedampft, um alles Histidin in das gut krystallisierende

Dichlorid überzuführen. Schließlich wurde langsam bei gelinder Wärme zum Sirup eingeengt. Hierbei erstarrte die Masse zu einem Krystallbrei. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Dann wurden sie in heißem Wasser gelöst und durch Kochen mit Tierkohle entfärbt. Die geklärte Flüssigkeit wurde noch mehrmals mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade abgeraucht. Schließlich wurde langsam zum dünnen Sirup eingeengt; aus diesem schied sich das Dichlorid nach dem Impfen mit einem Kryställchen reinen Histidindichlorids in schönen großen Tafeln aus. Die Krystalle wurden abgesaugt und erst mit etwas konzentrierter Salzsäure, dann mit absolutem Alkohol gewaschen. Das so gewonnene Dichlorid schmolz bei 228—230° gleichzeitig mit einem Kontrollpräparate reinen Histidindichlorids. Mit Natronlauge und einem Tropfen Kupfersulfat erwärmt, gab die Substanz eine zunächst violette, dann in rot umschlagende Verfärbung. Mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung reagierte sie mit tief dunkelroter Farbe. Dadurch war die Substanz schon an sich als Histidin charakterisiert. Zur endgültigen Feststellung führte ich sie nach den Angaben von Steudel in das Pikrolonat über und analysierte dasselbe. Die gefundenen Werte stimmen für Histidinpikrolonat.

0,1220 g Substanz gaben 0,2043 g CO₂ und 0,0433 g H₂O.

0,1112 „ „ „ 22,1 ccm N: T. = 12°; Ba = 752 mm.

Berechnet für C₆H₉N₃O₂ · C₁₀H₈N₄O₅:

C = 45,8%

H = 4,1%

N = 23,4%

Gefunden:

C = 45,7%

H = 4,0%

N = 23,6%

Das Pikrolonat schmolz bei 220°.

In einem anderen Falle vermochte ich bei der Verarbeitung einer kleineren Quantität Harn kein Histidin, wohl aber einen diesem zweifellos sehr nahestehenden Körper zu isolieren. Ich verfuhr hierbei folgendermaßen: Etwa 14 Liter Harn wurden mit neutraler konzentrierter Bleiacetatlösung ausgefällt, vom Niederschlag abgesaugt und aus dem Filtrat das überschüssige Blei mit Natriumcarbonat beseitigt; vom ausgeschiedenen Bleiweiß wurde durch Filtration getrennt und die so gereinigte Flüssigkeit auf freiem Feuer auf etwa 1/3 ihres Volumens eingeengt.

Dann wurde mit Essigsäure schwach sauer gemacht und mit heißgesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung ausgefällt. Die Fällung wurde abgesaugt und genau in der oben geschilderten Weise behandelt. Auch hier wurde so oft mit Alkohol aufgenommen, bis sich die aus den Quecksilberverbindungen dargestellten Chloride in der Kälte klar darin lösten. Die unlöslichen Rückstände waren frei von Diazoreaktion gebenden Substanzen. Schließlich wurde zur Vertreibung der Salzsäure noch einigemal mit Alkohol abgedampft und dann mit Silbernitrat vom Chlor befreit, vom ausgeschiedenen Chlorsilber abfiltriert und das Filtrat mit soviel Silbernitratlösung versetzt, daß eine Probe der Flüssigkeit mit Barythydratlösung eine braune Fällung gab. Dann wurde die Masse mit Barythydratlösung versetzt und feingepulvertes Baryumhydrat im Überschusse eingetragen. Es wurde damit längere Zeit unter öfterem Umrühren stehen gelassen. Darauf wurde die entstandene Fällung abgesaugt und sorgfältig mit Wasser ausgewaschen. Die Fällung wurde mit verdünnter Salpetersäure aufgenommen, vom Unlöslichen filtriert und in das Filtrat nochmals Baryumhydrat im Überschusse eingetragen. Die dadurch erzeugte Silberfällung wurde nach einigem Stehen abgesaugt und mit Wasser gut gewaschen. Dann wurde sie in verdünnter Salpetersäure gelöst und tropfenweise mit Ammoniak versetzt, solange die Flüssigkeit mit ammoniakalischer Silberoxydlösung eine Trübung gab. Die Fällung wurde abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Darauf wurde sie mit warmer verdünnter Salzsäure zersetzt. Das Filtrat vom Chlorsilber wurde auf dem Wasserbade mehrmals mit konzentrierter Salzsäure abgeraucht, mit heißem Wasser aufgenommen, durch Aufkochen mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Aus dem Filtrat wurden durch vorsichtigen tropfenweisen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure Spuren von Baryt ausgefällt, vom Baryumsulfat abgesaugt und zum Sirup eingeengt. Dieser erstarrte nach einiger Zeit krystallinisch. Die Masse wurde hierauf mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Nach einigem Stehen schied sich ein Pikrolonat ab. Dasselbe wurde abgesaugt, mit Alkohol sorgfältig gewaschen und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Beim erneuten Umkrystallisieren blieb

der Zersetzungspunkt konstant. Das Salz war nicht identisch mit Histidinpikrolonat. Es hatte eine hellere Farbe und krystallisierte auch beim langsamen Abdunsten der Lösung in viel kürzeren Nadelchen als das Histidinpikrolonat. Es zersetzte sich, ohne vorher zu schmelzen, bei 244°. Es handelt sich hier jedenfalls um das nächst niedere Homologe des Histidins, also um eine Aminoimidazolessigsäure.

Ich lasse hier die gefundenen Analysenwerte folgen:

0,1018 g Substanz gaben 0,1666 g CO₂ und 0,0388 g H₂O.

0,1003 „ „ „ 21,4 ccm N; T. = 12°; Ba 752.

Für C₆H₇N₃O₂ · C₁₀H₈N₄O₆

Berechnet:	Gefunden:
C = 44,4%	C = 44,6%
H = 3,7%	H = 4,3%
N = 24,3%	N = 25,3% ¹⁾

Aus einem Teil dieses Pikrolonats stellte ich das Chlorid wieder her durch Ansäuern mit Salzsäure und Ausschütteln mit Äther. Dasselbe gab mit einer alkalischen Lösung von Diazobenzolsulfosäure eine dunkelrote Verfärbung. Mit Natron- und Kupfersulfat erwärmt färbte es sich rot. Das Auftreten eines violetten Farbtones konnte nicht beobachtet werden. Diese Reaktionen weisen deutlich genug auf den Besitz eines Imidazolkernes und die nahe Beziehung zum Histidin hin. Aus der Mutterlauge dieses Pikrolonats krystallisierte beim Einengen ein weiteres Salz in geringer Menge aus. Dasselbe schmolz bei 230°. Es lieferte bei der Verbrennung 49,6% Kohlenstoff und 3,0% Wasserstoff.

0,0689 g Substanz gaben 0,1254 g CO₂ und 0,0184 g H₂O.

Man könnte hier an ein höheres Homologe des Histidins denken. Doch erlaubt es die geringe zur Analyse gelangende Substanzmenge nicht, einen bestimmten Schluß aus den gefundenen Zahlen zu ziehen. Histidinpikrolonat konnte ich, wie schon oben bemerkt, hier nicht isolieren, vielleicht lag dies daran, daß die Aufteilung durch Fällung mit Platinchlorid und mit Cadmiumchlorid unterlassen war, so daß die Histidinfraktion zu viele Substanzen enthielt, die sich gegenseitig an der Kry-

¹⁾ Der zu hohe N-Wert erklärt sich dadurch, daß etwas CO in das Absorptionsrohr gelangt war.

stallisation hinderten. Die nicht krystallinische Mutterlauge gab denn auch nach Beseitigung der Pikrolonsäure eine sehr intensive Diazoreaktion. Mit Silbernitrat und Ammoniak ließen sich 0,4 g Silberverbindungen aus ihr gewinnen. Dieselben enthielten beträchtlich weniger Silber und mehr Kohlenstoff als Histidinsilber. Es war zweifellos ein Gemenge von dem Histidin nahestehenden, zum Teil höher molekularen Substanzen. Eine derartige konnte ich ja in der oben geschilderten Weise als Goldsalz isolieren.

Mit dem Nachweis von Imidazolderivaten ist die eine, und zweifellos die bedeutsamste Komponente der Diazoreaktion des normalen Harns aufgefunden; die zweite sind die aromatischen Oxysäuren.¹⁾ Durch Quecksilberchlorid und Natriumacetatlösung lassen sich jedoch nicht alle Imidazolderivate niederschlagen, wohl aber scheinbar mit Phosphorwolframsäure. Man kann sich hiervon überzeugen, wenn man das Filtrat der Quecksilberchlorid-Natriumacetatfällung vom Quecksilber befreit einengt und nach vorherigem Ansäuern die Oxysäuren durch Extraktion mit Äther entfernt. Dann gibt die Flüssigkeit immer noch eine starke Diazoreaktion. Dieselbe verschwindet fast ganz, wenn man nunmehr die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure ausfällt. Zersetzt man die Phosphorwolframsäurefällung mit Baryt, so zeigt die daraus gewonnene Lösung der Basen eine starke Reaktion. Durch Silbernitrat und Barytwasser lassen sich die sie bedingenden Substanzen quantitativ niederschlagen.

Die aus dieser Fällung mit Salzsäure gewonnene Lösung der Chloride gibt mit Diazobenzolsulfosäure in alkalischer Lösung eine tief dunkelrote Farbe. Diese Silberfällung habe ich bis jetzt noch nicht näher untersucht.

Auch die Tiere scheiden Imidazoderivate aus. Doch scheint hier zwischen Fleisch- und Pflanzenfressern eine starke Differenz zu bestehen. Die Pflanzenfresser scheiden anscheinend sehr viel mehr Imidazoderivate aus als die Fleischfresser. Daß der Harn der Fleischfresser nur eine sehr schwache, der der Pflanzenfresser dagegen eine sehr starke Diazoreaktion gibt, war schon länger bekannt.²⁾ Die aus Harn von Pferden und Ka-

¹⁾ Siehe hierzu Clemens, Deutsch. Archiv f. klinische Medizin, 1899, Bd. LXIII, S. 74.

²⁾ Clemens, l. c.

ninchen gewonnenen Quecksilberchlorid- und Natriumacetatfällungen liefern denn auch eine sehr intensive Diazoreaktion. Dieselbe ist bedeutend stärker als beim menschlichen Harn. Die Fällungen aus Hunde- und Katzenharn geben nur schwache Reaktionen. In allen Quecksilberchlorid-Natriumacetatfällungen lassen sich aber die die Reaktionen bedingenden Substanzen durch Silbernitrat und Barytwasser quantitativ niederschlagen.

Die Frage, wie es kommt, daß Histidin und andere Imidazol-derivate im Harn in merklichen Mengen auftreten, ist wohl dahin zu beantworten, daß das Imidazol als zyklische Verbindung bis zu einem gewissen Grade der physiologischen Verbrennung Widerstand leistet. In dieser Beziehung bildet es ein genaues Analogon zum Benzol, das aus dem Tyrosin stammend mit verschiedenartigen Seitenketten im Harne erscheint. Auch im Verhalten der beiden Grundernährungstypen der Säugetierwelt besteht gegenüber Benzol und Imidazol scheinbar eine Analogie. Die Pflanzenfresser scheiden, wie oben bemerkt, jedenfalls mehr Imidazolderivate ab als die Fleischfresser, wie sie auch mehr Benzolderivate abscheiden.

Es scheint also der Organismus des Fleischfressers besser geeignet zu sein zur Verbrennung zyklischer Eiweißspaltungsprodukte, als der des Pflanzenfressers. Dies geht auch aus folgendem Versuch hervor. Ich injizierte einer Katze Histidin subkutan. Der Harn dieses Tieres zeigte nur spurenhafte Verstärkung der Diazoreaktion, bei einem Kaninchen hingegen trat bei der subkutanen Applikation der gleichen Quantität Histidin eine erhebliche Verstärkung der Diazoreaktion des Harnes auf.

Das im Harn auftretende Histidin und seine Verwandten stammen jedenfalls größtenteils aus den Muskeln, unter deren Extraktivstoffen das Histidin, wie Kutscher¹⁾ gezeigt hat, konstant in recht beträchtlichen Mengen auftritt. Es ist damit dem Methylguanidin, Vitiatin und Kreatin an die Seite zu stellen, die ja auch unter den Muskelextraktivstoffen auftreten und im Harne wenig oder garnicht verändert erscheinen.

¹⁾ Zentralblatt f. Physiologie, Bd. XXI, Nr. 2 u. 18.