

Eine neue Reaktion zum Nachweis und zur Bestimmung der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn

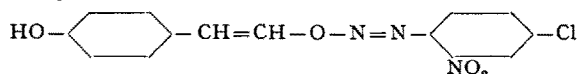
Die *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure (*p*-Opbs) entsteht intermediär beim oxydativen Abbau des («nicht natürlichen») *d*-Tyrosins¹ und wird bei bestimmten Störungen des Stoffwechsels im Harn ausgeschieden². Da sie nur von der Leber abgebaut wird, eignet sie sich als Testsubstanz für deren Funktionsprüfung und hat sich bereits in zahlreichen klinischen Versuchen bewährt³. Dabei wird der Patient mit 2 g *p*-Opbs belastet und geprüft, wieviel er davon wieder ausscheidet; werden mehr als 8–10 % wiedergefunden, so ist die Leber geschädigt⁴. Bisher wurde die Ketosäure im Harn entweder mit der MILLONSCHE Reaktion oder als Hydrazon bestimmt. Beide Verfahren erfassen aber auch andere Bestandteile des Harns. Wir suchten deswegen die Diazoreaktion der *p*-Opbs zu einer spezifischen Probe auszubauen.

Nach zahlreichen Vorversuchen mit verschiedenen Diazoniumsalzen erwies sich dasjenige des 4-Chlor-2-nitroanilins als am geeignetsten. Es ist als Chlorzinkdoppelsalz unter dem Namen Echtrotsalz 3 GL im Handel. Mit diesem kuppelt die *p*-Opbs bei saurer Reaktion (p_H 3–6) zu einem intensiv rot gefärbten Farbstoff, der in Prismen kristallisiert und sich bei 227–228° zersetzt. Andere Oxyphenylderivate, wie Tyrosin, *p*-Oxyphenylmilchsäure und *p*-Oxyphenylpropionsäure reagieren unter den gleichen Bedingungen nicht. Das Kupplungsprodukt der *p*-Opbs gibt im Gegensatz zur freien Säure kein Hydrazon, löst sich nicht

in Soda und entfärbt Kaliumpermanganat. Wir vermuten daher, daß die *p*-Opbs nicht am Ring, sondern an der Seitenkette gekuppelt wird, die Carbonylgruppe nicht mehr frei und die Carboxylgruppe abgespalten ist; ferner, daß zwischen den beiden verbliebenen C-Atomen der Seitenkette eine Doppelbindung aufgetreten ist. Freie Kohlensäure ließ sich allerdings nicht nachweisen; wahrscheinlich wird sie von den in der Echtrotsalzlösung enthaltenen freien Zinkionen gebunden. Weiter wurde mittels Tüpfeltitration gegen H-Säure (1-Amino-8-naphthol-3,6-disulfonsäure) gefunden, daß die *p*-Opbs nur mit einem Mol des Diazoniumsalzes reagiert. Die Elementaranalyse ergab:

Für $C_8H_7O_2 \cdot C_6H_3N_2O_2Cl$ (319,57) gefunden: C 52,23, H 3,60, N 13,96, Cl 12,44; berechnet: C 52,57, H 3,15, N 13,15, Cl 11,07.

Die vorliegenden Befunde lassen sich vorläufig durch folgende Formel für den roten Diazofarbstoff der *p*-Opbs wiedergeben:



Im Harn treten noch andere Substanzen auf, die ebenfalls mit Echtrotsalz 3 GL gefärbte Diazoverbindungen geben. Sie können jedoch an einer Säule von Aluminiumoxyd (standardisiert nach BROCKMANN) chromatographisch abgetrennt werden. Wir haben frischem Harn von gesunden Personen *p*-Opbs zugesetzt, die Mischung bei 0° mit Echtrotsalz 3 GL gekuppelt und darauf die Farbstoffe mit peroxydfreiem Äther extrahiert.

Läßt man die ätherische Farbstofflösung durch eine Aluminiumoxydsäule laufen, dann entwickeln sich bis zu 7 verschieden gefärbte Zonen, wobei der rote Farbstoff der *p*-Opbs am oberen Rand der 6. Zone (6a) haftet (Abb. 1). Um diese Zone abtrennen zu können, benützen wir eine Glasröhre, die in der Mitte durch einen Schliff geteilt ist, und waschen so lange mit Äther nach, bis die

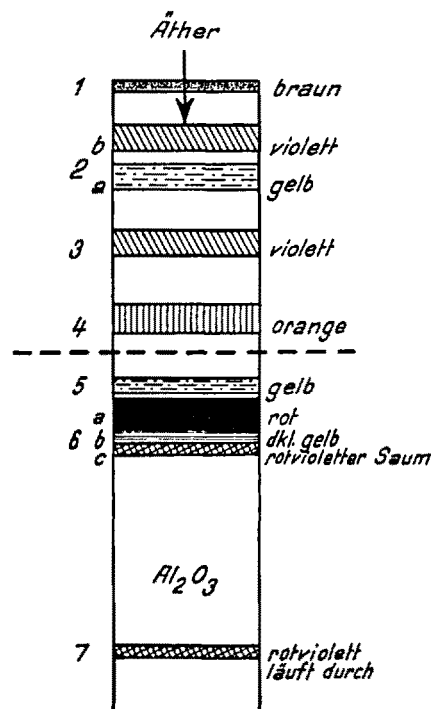


Abb. 1.

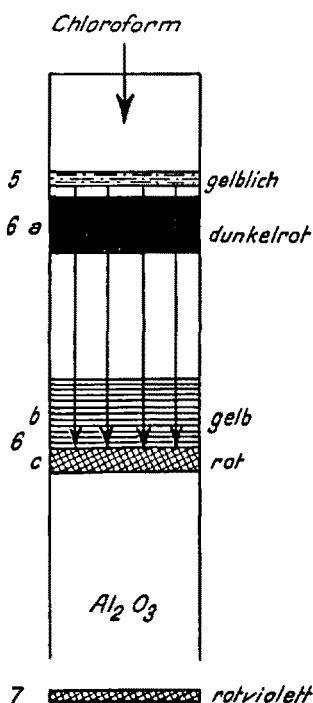


Abb. 2.

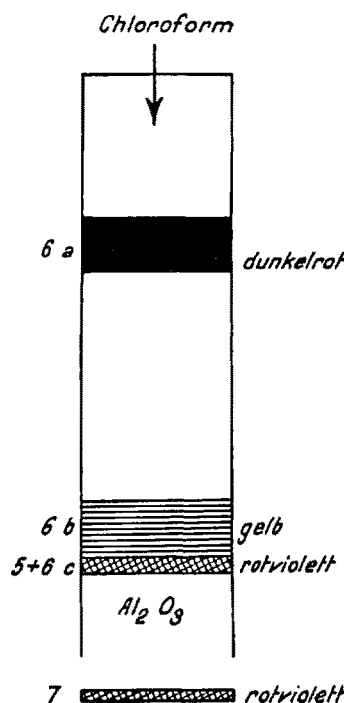


Abb. 3.

¹ K. FELIX und K. ZORN, Z. physiol. Chem. 268, 257 (1941).

² G. MEDES, Biochem. J. 26, 922 (1932). – Vgl. u. a. H. A. PAINTER und S. S. ZILVA, Biochem. J. 41, 511 (1947).

³ K. FELIX und R. TESKE, Z. physiol. Chem. 267, 173 (1941). – K. FELIX, Z. physiol. Chem. 281, 36 (1944). – W. NONNENBRUCH, Dtsch. med. Ws. 73, 40 (1948).

⁴ K. FELIX, Schweiz. med. Wschr. 78, 1165 (1948).

Zone 6 vollständig unter dem Schliff sichtbar wird. Dann wird die obere Hälfte der Säule abgenommen und die untere mit Chloroform ausgewaschen. Dabei wandern die Zonen 5 sowie die gelben und roten Anteile der Zone 6 (6b und c) in die unteren Partien, während die dunkelrote Zone der *p*-Opbs (6a) etwa an ihrem Platz verbleibt (Abb. 2 und 3). Man nimmt nun diesen Teil der Säule heraus und eluiert den Farbstoff mit Essigester, dem einige Tropfen Eisessig zugegeben worden sind. Zugesezter *p*-Opbs-Farbstoff wurde mit diesem Verfahren aus dem Harn ohne Verlust zurückgewonnen. Zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung haben wir eine Eichkurve aufgestellt, indem wir reine *p*-Opbs im Bereich von 0,1–1 mg in der gleichen Weise mit Echtrotsalz 3 GL kuppelten und chromatographierten. Die Kurve verlief geradlinig und ging durch den Nullpunkt.

Wir haben mit diesem Verfahren den Harn mehrerer gesunder Personen und verschiedener leberkranker Patienten analysiert, aber in keinem Fall den dunkelroten Farbring beobachtet, der für den Diazofarbstoff der *p*-Opbs charakteristisch ist. Ebensowenig blieben an dieser Stelle andere Farbstoffe haften. Somit dürfte diese Methode die *p*-Opbs spezifisch nachweisen.

Von welchen Bestandteilen des Harns die Farbstoffe der anderen Zonen herrühren, konnte noch nicht ermittelt werden. Brenztraubensäure, Tryptophan und Ascorbinsäure bilden unter diesen Versuchsbedingungen ebenfalls Farbstoffe, die sich aber bei der Chromatographie nicht als einheitlich erwiesen.

Die *p*-Opbs (Testacid) stellte uns das Chemiewerk Bad Homburg AG., das Echtrotsalz und andere Diazoniumsalze die Naphtholchemie in Offenbach/Main zur Verfügung. Besonders möchten wir Herrn Dr. Huss, dem Leiter der Diazoabteilung der Farbwerke Hoechst für seine zahlreichen Ratschläge danken.

K. FELIX und G. LEONHARDI

Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M., den 12. November 1949.

Summary

p-Hydroxyphenylpyruvic acid reacts immediately with diazotized 4-chlor-2-nitroaniline, developing a deep red colour. The reaction is specific and can be used for the quantitative determination of this keto-acid in urine.

Excrétion des 17-cétostéroïdes chez l'homme normal¹

Dans le but d'étudier l'élimination urinaire des hormones stéroïdes chez des malades atteints de cancer, nous avons déterminé préalablement les valeurs moyennes de l'excrétion des 17-cétostéroïdes (17-CS) chez des individus sains ou non-cancéreux.

Matériel et méthode

Cette étude porte sur 58 personnes (25 hommes et 33 femmes) en bonne santé ou hospitalisés pour diverses maladies n'affectant pas l'excrétion des 17-CS; dans la majorité des cas hospitalisés, il s'agit de malades convalescents².

¹ Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de la Ligue nationale suisse contre le cancer.

² Nous tenons à remercier MM. les Prof. DECKER, ROCHAT et ROSSELET et M. le Dr. A. DELACHAUX qui nous ont permis et facilité le rassemblement de ces cas.

On utilise généralement 400 cm³ du mélange des urines de 24h. Après hydrolyse avec 10% de HCl conc. on extrait suivant la méthode décrite par JAYLE¹ pour les œstrogènes. L'extrait étheré débarrassé des œstrogènes par NaOH (N) est lavé par de l'eau distillée, puis évaporé sous vide à 0° C. Le résidu sec est repris dans 5 cm³ d'alcool absolu rectifié suivant la méthode préconisée par CALLOW et al².

Pour la détermination colorimétrique, on emploie la méthode de ZIMMERMANN³ modifiée de la manière suivante: 0,5 cm³ de solution alcoolique de 17-CS + 1,0 cm³ métadinitrobenzène solution à 1% dans alcool absolu rectifié + 1,0 cm³ KOH (5N) solution aqueuse titrée (conservée en flacons paraffinés). Les tubes sont placés dans un thermostat à 25° et à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture des résultats est faite aussitôt après au moyen du colorimètre à cellule photoélectrique *Electro-synthèse*. Une seule lecture est faite avec filtre bleu-vert; un tube témoin ne contenant pas de 17-CS mais seulement les réactifs traités de la même manière que les échantillons à doser – sert à fixer le zéro de l'appareil.

Une courbe d'étalonnage a été obtenue préalablement avec des solutions d'androstérone pure, cristallisée (Ciba) de concentration connue. Elle permet de transformer immédiatement les déviations de l'aiguille du galvanomètre en milligrammes d'androstérone. Par convention, et dans ces conditions strictement standardisées, nos résultats sont exprimés en *milligrammes d'androstérone par litre d'urine de 24 h.*

Résultats

Toute appréciation des résultats de dosage des 17-CS doit tenir compte de l'âge de l'individu. On sait que l'excrétion des 17-CS varie avec l'âge (ROBINSON⁴). C'est la raison pour laquelle nous avons recherché les valeurs normales dans les diverses classes d'âge. Il est évident que l'on doit s'attendre aussi à relever des différences entre les 2 sexes de même classe d'âge. Nos résultats sont résumés dans le tableau I.

Tableau I

Classe d'âge	♂			♀		
	T	n	σ	T	n	σ
20–29	12,1	3	0,17	11,5	8	2,4
30–39	10,9	4	2,2	10,7	7	2,4
40–49	–	–	–	11,6	4	3,3
50–59	9,7	3	1,5	–	–	–
60–69	6,3	7	1,8	7,6	5	2,3
70–79	9,0	4	2,8	8,9	5	3,2

T taux moyen en mg 0/00 (24 h)
n nombre de cas
σ coefficient de dispersion

Il ressort de ces déterminations que le taux moyen des 17-CS diminue avec l'âge des individus. Par ailleurs, ce taux n'est pas sensiblement différent dans l'un et l'autre sexe. On remarque de plus que le taux moyen, après avoir atteint entre 60 et 69 ans une valeur qui est environ 2 fois plus faible qu'entre 20 et 29 ans, tend à remonter ensuite vers des valeurs plus élevées (figure 1).

¹ M.F. JAYLE, Exp. ann. Bioch. (Masson, Paris 1944) p. 191; Bull. Soc. Chim. biol. 25, 300 (1943).

² R.K. CALLOW, N.M. CALLOW et C.W. EMMENS, Biochem. J. 32, 1313 (1938).

³ W. ZIMMERMANN, Z. physiol. Ch. 233, 257 (1935).

⁴ A.M. ROBINSON, Brit. J. Cancer 2, 13 (1948).