

115. Zur Bestimmung des Aneurins im menschlichen Harn

von **M. Kofler** und **L. Sternbach**.

(4. VIII. 41.)

Unter den chemischen Bestimmungsmethoden von Aneurin ist die von *Jansen*¹⁾ eingeführte Thiochrom-Methode die gebräuchlichste. Sie beruht auf der Oxydation von Aneurin zu Thiochrom, das mit Isobutanol ausgeschüttelt und fluorometrisch bestimmt wird. Die Bestimmung der Fluoreszenzhelligkeit kann unter Verwendung von elektrischen und optischen Messgeräten ausgeführt werden¹⁾, doch kommt man auch ohne diese Hilfsmittel zu befriedigenden Ergebnissen. Man bringt in diesem Falle die zu untersuchende Lösung und eine Lösung von bekanntem Thiochromgehalt vor die Quarzlampe und verdünnt eine Lösung so lange, bis man den Eindruck gleicher Fluoreszenzhelligkeit hat²⁾.

Für die Bestimmung des Aneurins im Harn sind verschiedene Variationen der Thiochrommethode beschrieben worden³⁾⁴⁾. Dabei kann man, abgesehen von der Art der Messung der Fluoreszenzhelligkeit zwei Hauptrichtungen unterscheiden: Einige Autoren adsorbieren das Aneurin an ein Pulver mit grosser Oberfläche (z. B. Franconit) und oxydieren erst das vom Adsorbens abgelöste Aneurin, andere oxydieren Aneurin im Harn direkt ohne vorherige Abtrennung. Die Frage, ob es nötig sei, Aneurin vor seiner Oxydation zu Thiochrom aus dem Harn durch Adsorption herauszuholen oder ob eine Oxydation direkt im Harn zulässig sei, ist Gegenstand vieler Diskussionen gewesen und bis heute noch nicht eindeutig entschieden worden. Für das Verfahren mit Adsorption spricht die Tatsache, dass dadurch eine weitgehende Trennung von Harnbestandteilen erreicht wird, welche die Fluorescenz des Thiochroms beeinträchtigen können. Andererseits bedeutet das Adsorbieren ein Komplikation und schliesst die Möglichkeit von Verlusten in sich.

Die Hauptschwierigkeit bei der Bestimmung von Aneurin im Harn liegt darin, dass dieser noch andere fluorescierende Stoffe enthält, die sich bei der Bestimmung des Aneurins störend bemerkbar machen. Auch bei den mit Adsorption arbeitenden Verfahren gelangt ein Teil der fluorescierenden Stoffe mit in die Lösung, in welcher Aneurin schliesslich bestimmt wird, wenn schon auf diesem Gebiete

¹⁾ *Jansen, B. C. P.*, R. **55**, 1046 (1936).

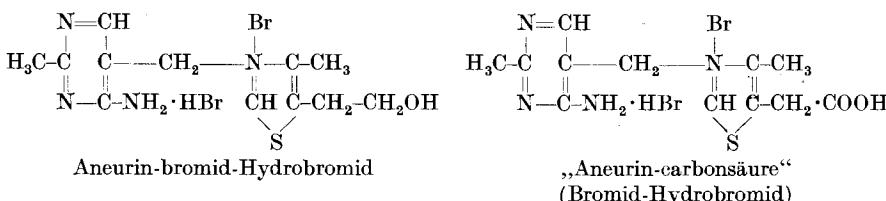
²⁾ *Karrer, W., Kubli, U.*, Helv. **20**, 369 (1937).

³⁾ *Westenbrink, H. G. K., Goudsmit, J.*, Nederl. Tijdschr. Geneeskunde **81**, 2632 (1937). ⁴⁾ *Karrer, W.*, Helv. **20**, 1147 (1937).

durch geeignete Wahl von Adsorptionsmitteln Verbesserungen erzielt worden sind¹⁾.

Bei den direkten Verfahren, die ohne Adsorption auskommen, ist man genötigt, die störende Nebenfluorescenz durch geeignete Vorbehandlung des Harns möglichst zu entfernen²⁾³⁾. Nach *Ritsert*⁴⁾ soll es möglich sein, bei genauer Einhaltung der von ihm angegebenen Versuchsbedingungen die Nebenfluorescenz restlos zu eliminieren. Wir konnten dagegen in Übereinstimmung mit anderen Autoren⁵⁾ konstatieren, dass auch dann noch ein Rest einer weisslichen Fluorescenz übrig bleibt, welche den Vergleich mit einer Lösung von reinem Thiochrom erschwert. Dieser Nachteil lässt sich nach unseren Erfahrungen durch Vorschalten einer blauvioletten Glasplatte ausschliessen.

Die Frage, welche Stoffe die weissliche Fluoreszenz des Harnes hervorrufen, ist bisher noch nicht beantwortet worden. Interessant ist in dieser Hinsicht das Verhalten eines Derivates von Aneurin, welches in der Seitenkette des Thiazolkernes statt der Carbinolgruppe eine Carboxylgruppe trägt (vgl. nachstehende Formeln) und welches im Folgenden kurz als „Aneurin-carbonsäure“ bezeichnet wird.



Diese „Aneurin-carbonsäure“ sowie ihr Ester und ihr Amid besitzen die spezifische Vitamin B₁-Wirkung des Aneurins nicht. Auch in sehr hohen Dosen vermögen sie die Bradycardie von Vitamin B₁-frei ernährten Ratten nicht zu beeinflussen. Sie üben auch keine Wachstumswirkung auf Phycomyceskulturen aus. Behandelt man die Aneurin-carbonsäure mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) in alkalischer Lösung, so entsteht ebenfalls eine fluoreszierende Substanz. Ihre Fluorescenz unterscheidet sich von derjenigen des Thiochroms durch geringe Intensität und eine weissliche Nuance.

Ob ein Teil des Aneurins im Organismus in „Aneurin-carbonsäure“ überzugehen vermag, ist noch nicht untersucht worden. Ein solcher Übergang wäre aber durchaus im Bereich der Möglichkeit, liegt doch im Aneurin, ähnlich wie im Cholin, ein Alkamin vor, das neben einer quartären Ammoniumgruppe die gleiche Oxäthylseitenkette trägt wie das Cholin. Cholin geht in der Leber der Warmblüter

¹⁾ Jowett, M., Biochem. J. **34**, 1348 (1940).

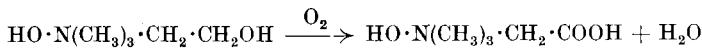
²) Wang, Y. L., Harris, L. J., Biochem. J. **33**, 1356 (1939).

³⁾ Ritsert, K., Dtsch. med. Wschr. **64**, 481 (1938).

⁴⁾ Ritsert, K., Klin. Wschr. 19, 446 (1940).

⁵⁾ Pezold, F., Dittmar, E., Klin. Wschr. **19**, 1234 (1940).

unter der Einwirkung eines oxydativen Fermentes, der Cholindehydase, in die entsprechende Carbonsäure, das Glykokoll-betain über, gemäss folgender Formel:



Eine entsprechende Umwandlung von Aneurin in „Aneurin-carbonsäure“ würde eine Erklärung bieten für die Tatsache, dass nach oraler und parenteraler Darreichung nicht alles Aneurin mit der Thiochrommethode im Harn aufgefunden werden kann. Bis heute ist allerdings die „Aneurin-carbonsäure“ weder im Harn noch in andern Körperflüssigkeiten als biologisches Oxydationsprodukt des Aneurins eindeutig nachgewiesen worden.

Experimenteller Teil.

1. Bestimmung von Aneurin im Harn.

Man pipettiert 5 cm³ Harn in ein Erlenmeyerkölbchen von 100 cm³ Inhalt, setzt 35 cm³ Wasser, 1 cm³ Salzsäure (25-proz.) und 15 g wasserfreies pulverisiertes Natriumsulfat hinzu und erwärmt auf 50—55°. Dann stellt man das Kölbchen während 10 Minuten in ein mit Wasser gefülltes Becherglas, dessen Temperatur auf etwa 35° gehalten wird, so dass der verdünnte Harn während 10 Minuten bei etwa 50—55° bleibt. Dabei wird so lange gerührt, bis das Natriumsulfat in Lösung gegangen ist. Nun giesst man den noch warmen Inhalt des Kölbchens in einen Scheidetrichter von 100 cm³ Inhalt, dessen Hahnbohrung möglichst weit und dessen Auslaufrohr möglichst kurz sei. Man setzt 10 cm³ Isobutanol zu, schüttelt 1 Minute, wartet bis zur sauberen Phasentrennung und lässt die untere, wässrige Phase in einen gleichen Scheidetrichter ab, wo sie nochmals mit 10 cm³ Isobutanol ausgeschüttelt wird. Schliesslich wird diese Operation ein drittes Mal wiederholt. Dabei krystallisiert gewöhnlich ein Teil des Natriumsulfates aus. Sollte dadurch die Bohrung verstopft werden, so wird mit einem ausgezogenen Glassstab nachgeholfen. Nach dem 3-maligen Ausschütteln lässt man die untere, wässrige Phase (samt eventuell ausgeschiedenem Salz) in einen graduierten, mit Glasstöpsel versehenen Standzylinder von 100 cm³ Inhalt ab, fügt 40 cm³ 15-proz. Natronlauge und 5—10 cm³ 1-proz. Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung hinzu. Es wird so viel Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung zugesetzt, bis die Lösung hellgelb bleibt. Nach kurzem Durchschütteln lässt man zwei Minuten stehen, setzt 20 cm³ Isobutanol zu und schüttelt während zwei Minuten. Nachdem sich eine saubere Phasentrennung hergestellt hat, saugt man mit einer Pipette von der oberen (isobutanolischen) Schicht einen möglichst grossen Teil ab und filtriert in ein Reagensglas (Lösung A).

Die Vergleichslösung wird wie folgt hergestellt: Man entnimmt mit einer Pipette einer Ampulle Benerva „Roche“ 1 cm³ Lösung = 5 mg Aneurin und verdünnt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter. Davon pipettiert man 2 cm³ (entsprechend 10 γ Aneurin) in einen graduierten, mit Glasstöpsel versehenen Messzylinder von 100 cm³ Inhalt, den man mit 15 g wasserfreiem pulverisiertem Natriumsulfat beschickt hat, füllt mit Wasser auf 40 cm³ und mit 15-proz. Natronlauge auf 80 cm³ auf und fügt 5 Tropfen Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (1-proz.) hinzu. Das Ausschütteln mit Isobutanol erfolgt wie oben. Die 10 γ Aneurin sind jetzt in Form von Thiochrom in die 20 cm³ Butanol übergegangen; der Gehalt an Thiochrom entspricht daher 0,5 γ Aneurin pro cm³ Isobutanol (Lösung B).

Zur Vergleichsbestimmung bringt man die Lösungen A und B vor die Quarzlampe und verdünnt die stärker fluoreszierende Lösung bis zur Intensitätsgleichheit. Die Beobachtung geschieht durch ein dunkles Blauglas, um durch die weissliche Nebenfluoreszenz des Harnextraktes nicht gestört zu sein. Man habe etwa 3 cm³ Isobutanol zu 1 cm³

Vergleichslösung geben müssen bis zur Erreichung gleicher Fluorescenzhelligkeit. Dann stellt man, weil der Entscheid beim Zugeben aus einer Bürette nicht leicht zu fällen ist, zur Sicherheit noch eine Verdünnungsreihe her: Man füllt in einige Reagensgläser je 1 cm^3 Vergleichslösung und gibt solche Mengen von Isobutanol zu, die sich etwa um 30% unterscheiden und welche die als richtig angesehene Verdünnung einschliessen, also im obigen Falle 2,3, 3 und 4 cm^3 Isobutanol. Da ferner Täuschungen entstehen können, wenn die Reagensgläser ungleiche Mengen an Lösung enthalten, giesst man von den einzelnen Reagensgläsern nach vollzogener Verdünnung so viel aus, dass sie alle ungefähr die gleiche Menge enthalten. Jetzt ist es leicht, vor der Analysenlampe zu entscheiden, zwischen welchen Lösungen bekannten Gehaltes der Harnextrakt liegt.

Die Berechnung geschieht dann wie folgt: Wir wissen, dass die 1 cm^3 Vergleichslösung $+ x\text{ cm}^3$ Isobutanol enthaltende Lösung die gleiche Konzentration an Aneurin hat wie der isobutanolische Harnextrakt (streng genommen müsste man sagen die gleiche Konzentration an Thiochrom, für die Berechnung ist aber obige unrichtige Ausdrucksweise praktischer). Die Konzentration der verdünnten Vergleichslösung und damit auch des Harnextraktes beträgt aber $\frac{0,5}{1+x} \gamma$ Aneurin/ cm^3 . Folglich enthalten die 20 cm^3 Isobutanol-Harnextrakte 20mal mehr Aneurin und diese Menge entspricht 5 cm^3 des ursprünglichen unverdünnten Harnes, so dass 100 cm^3 Harn $\frac{200}{1+x} \gamma$ Aneurin enthalten. In unserem Beispiel war $x = 2,7$, somit enthalten 100 cm^3 Harn 58γ Aneurin.

Zusätzliche Bemerkungen.

Durch einen Blindversuch (Herstellung der Vergleichslösung ohne Aneurinzusatz) hat man sich zu überzeugen, dass die verwendeten Reagenzien, insbesondere Isobutanol, nicht oder nur in zu vernachlässigendem Masse fluorescieren. Die verwendeten Glaswaren müssen peinlich gereinigt werden; Schlitte sollen nicht gefettet werden; nach Gebrauch sind die Glaswaren sofort zu reinigen, weil die Schlitte sonst durch ausgeschiedenes Salz verkleben. Die Verwendung von Reagensgläsern aus Quarz ist angenehm, aber nicht unbedingt erforderlich. Es sollen nur solche Reagensgläser von gleichem Durchmesser verwendet werden, die leer vor der Lampe betrachtet sich nicht unterscheiden.

2. Darstellung von „Aneurin-carbonsäure“

[3-(4'-Amino-2'-methylpyrimidyl-5'-methyl)-4-methyl-5-carboxy-äthyl-thiazoliumbromid-hydrobromid].

a) **Methylester (Bromid-hydrobromid).** 9,7 g β -Bromlävulinsäure-methylester und 8 g 4-Amino-5-thioformamidomethyl-2-methylpyrimidin¹) werden in ca. 40 cm^3 wasserfreier Ameisensäure 6 Stunden lang auf 50° erhitzt. Hierauf versetzt man mit 7 g 60-proz. Bromwasserstoffsäure, dampft im Vakuum zur Trockne und verjagt die letzten Spuren von Feuchtigkeit durch zweimaliges Abdampfen mit Benzol. Man löst in Methanol, fällt mit Essigester und krystallisiert aus Methanol-Essigester um. Farblose Nadelchen vom Smp. 208 bis 208,5 $^\circ$ (korrig.) (bisweilen erhält man Plättchen oder Prismen vom gleichen Schmelzpunkt, aber niedrigerem Bromgehalt).

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_4\text{SBr}_2$ (+ H_2O) Ber. C 34,37 H 4,00%
Gef. „ 34,62 „ 4,35%

Pikrat des Methylesters. Es entsteht beim Zusammengießen der Komponenten in methylalkoholischer Lösung und scheidet sich

¹⁾ *Todd, A. R., Bergel, F., Soc. 364 (1937).*

nach Zugabe von Wasser beim Verdunsten der Lösung in gelben Prismen aus. Smp. 172—173° (korrig.).

$C_{25}H_{22}O_{16}N_{10}S$ Ber. C 40,01 H 2,95 N 18,66%
 Gef. „ 40,29 „ 3,16 „ 18,71%

b) Freie Säure (Bromid-hydrobromid). 1,7 g des Methylesters werden mit 30 cm³ Wasser und 5 cm³ konzentrierter Bromwasserstoffsäure zwei Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt. Die Lösung wird im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand in einigen Tropfen Wasser gelöst und mit Eisessig versetzt. Die nach einiger Zeit ausgefallenen Nadeln werden in der gleichen Weise umkristallisiert. Farblose Nadelchen vom Smp. 270—271° (korrig.).

$C_{12}H_{16}O_2N_4SBr_2(+H_2O)$ Ber. C 31,43 H 3,96 Br 34,9%
 Gef. „ 31,38 „ 3,86 „ 34,14%

c) Säureamid (Bromid-hydrobromid). 1,5 g des Esters werden in 100 cm³ konzentriertem Ammoniak gelöst. Nach 3 Tagen wird die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht und mit 7,5 cm³ 1,25-n. Bromwasserstoffsäure und 10 cm³ Alkohol versetzt. Das Gemisch wird wieder zur Trockne gebracht, in einigen Tropfen Wasser gelöst und aus Methanol-Essigester umkristallisiert. Farblose Prismen. Smp. 260—262° unter Zersetzung.

$C_{12}H_{17}ON_5SBr_2$ Ber. N 15,95 Gef. N 16,36%

Pikrat des Säureamids. Hergestellt auf die übliche Weise. Gelbe Nadeln vom Smp. 228—232° unter Zersetzung.

$C_{24}H_{21}O_{15}N_{11}S$ Ber. C 39,19 H 2,88 N 20,95%
 Gef. „ 39,44 „ 3,02 „ 21,25%

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.

116. Über das Gleichgewicht von Formaldehyd mit Glycin und Alanin

von Emil Baur.

(6. VIII. 41.)

Im Vorjahr teilte ich Messungen an Glycin-Formaldehyd-Lösungen mit¹), die über den Methin-Komplex (*Schiff'sche Base*) orientieren sollten. Da sich nach *Sörensen* die Aminosäuren über den Methin-Komplex titrieren lassen, ging ich davon aus, dass der Komplexbildung selbst und die elektrolytische Dissoziation des Komplexes — im Falle des Glycins: die Säure $CH_2:N \cdot CH_2 \cdot COOH$ — sollten

¹⁾ *Helv.* **23**, 233 (1940).