

CONTENTS

Excretion of Histidine from the Urine of Patients with Toxaemia of Pregnancy. (In the press of the Biochemical Journal.)
The excretion of histidine in normal pregnancy urine and in the urine of patients with toxaemia of pregnancy. (In the press of the Journal Obstet. and Gynaecol. Brit. Comm.)

BIOCHEMICAL STUDIES
on the
HISTIDINE METABOLISM
in
NORMAL and TOXAEMIC
PREGNANCY

By
Regine Kapeller - Adler, Dr. Phil.
Thesis for D.Sc.



Contents.

- 1) Isolation of Histamine from the urine of patients with toxæmia of pregnancy. (In the press of the Biochemical Journal).
- 2) The excretion of histidine in normal pregnancy urine and in the urine of patients with toxæmia of pregnancy. (In the press of the Journal Obstet. and Gynaecol. Brit. Emp.).
- 3) The significance of the isolation of histamine from the urine in the toxæmia of pregnancy. (In the press of the Journal Obstet. and Gynaecol. Brit. Emp.).

Previous papers on histidine metabolism in pregnancy:

- 1) A new method for the quantitative histidine estimation and its application to investigations of biological fluids especially of pregnancy urines.
- 2) A new chemical pregnancy diagnosis test.
- 3) The application of the new histidine test to investigations of pregnancy urines.
- 4) The determination of histidine by means of the "Stufenphotometer Zeiss".
- 5) The excretion of iminazol derivatives in the urine of mammals.
- 6) On histidine excretion in pregnancy.
- 7) The origin of the histidine in the urine of pregnant women.
- 8) The influence of the nutrition on the histidine excretion in pregnancy.
- 9) Notice to the paper: "Franz Földes: The occurrence of histidine in the urine of man".
- 10) Final notice to the paper: "Franz Földes: The occurrence of histidine in the urine of man".
- 11) Information on histidinuria in pregnant women.
- 12) Refined method of the chemical pregnancy test.
- 13) The influence of the gonadotropic hormones on the destruction of histidine in the liver.

The inclusion of this paper in the following number of the Journal cannot be guaranteed unless the proof is returned within 5 days of the date of this stamp to Professor C. R. HARRINGTON, F.R.S., University College Hospital Medical School, University Street, W.C. 1.

10. HISTIDINE METABOLISM IN TOXAEMIA OF PREGNANCY. ISOLATION OF HISTAMINE FROM THE URINE OF PATIENTS WITH TOXAEMIA OF PREGNANCY¹

By REGINE KAPELLER-ADLER

From the Institute of Animal Genetics and the Biochemical Laboratory of the Royal Infirmary, Edinburgh

(Received 16 December 1940)

IN the course of various investigations it has been demonstrated that histidine is a normal constituent of the urine of pregnant women, that it appears in the urine at a very early stage of pregnancy and continues to be excreted during the whole of gestation [Kapeller-Adler, 1933; 1934; 1936]. The rate of histidine excretion seems to vary with the individual and to be dependent on the kind of food taken [Kapeller-Adler & Schiller, 1935]. No histidine is to be detected in the urine of pregnant animals [Kapeller-Adler & Herrmann, 1934]. Further studies revealed the existence of a relationship between the excretion of histidine and that of gonadotropic hormones in human pregnancy [Kapeller-Adler *et al.* 1935; 1936; 1937]. The increase in the gonadotropic hormones during human gestation was assumed to be the cause of the non-destruction of histidine so that this amino-acid passes the liver unaffected and, not being deaminated by the kidneys, is excreted in the urine. Whereas histidinuria is characteristic of normal human pregnancy a more or less distinct alteration in histidine metabolism occurs in toxic pregnancy. The clinical importance of this alteration is considered in a paper at present in the Press [Kapeller-Adler, 1940]. Briefly the results obtained in the study of 58 cases of toxæmia of pregnancy of various types indicate that histidinuria is not appreciably affected in cases of mild toxic pregnancy, but is considerably diminished in patients with serious symptoms of pre-eclamptic toxæmia; in these little or no histidine is to be found in the urine. So constant is this that a marked diminution in histidine excretion can be used as a diagnostic sign of severe toxæmia of pregnancy.

It seemed possible that in severe toxæmia the histidine instead of being excreted as such was being transformed into some other substance, probably one of pharmacological activity. In this connexion decarboxylation of histidine to histamine had obviously to be considered, and several attempts have been made to detect histamine in the urine from toxæmic patients as well as from cases of normal pregnancy. In this paper these attempts are described.

EXPERIMENTAL

The method used depended upon precipitation of the histamine with $Zn(OH)_2$ [compare Ackermann, 1939], decomposition of the precipitate with H_2S , extraction of the resulting alkaline solution with amyl alcohol, re-extraction of the histamine from the amyl alcohol with $N/10 H_2SO_4$ or $M/10 HCl$, evapora- H N

¹ The substance of this paper was reported at a Meeting of the Biochemical Society in Edinburgh on 8 June 1940.



tion of this solution *in vacuo* and preparation of the histamine picrate or flavianate.

Exp. 1. 23 l. of urine of four patients with signs of severe toxæmia and no histidinuria were worked up. The urines were collected over chloroform and kept in the ice chest. Every 1000 ml. of the mixed urine were treated with 30 ml. of a saturated solution of freshly precipitated $Zn(OH)_2$ in ammonia (sp. gr. 0.880). After standing overnight the precipitate was filtered off, thoroughly washed with water and dried in air. The dry white powder was treated with dilute H_2SO_4 and freed from zinc by H_2S . The ZnS was filtered off and carefully washed with water. The filtrate was freed from H_2S by air-suction, made strongly alkaline with $NaOH$ and the NH_3 was removed by distillation *in vacuo* at 40° . This solution, completely free from NH_3 and having pH 9.5, was concentrated *in vacuo* to about 100 ml. and shaken 6 times with pure amyl alcohol, 50 ml. being used for each extraction. The combined amyl alcohol extracts were shaken 5 times with $N/10 H_2SO_4$ (in later experiments HCl) using 20 ml. each time. To remove traces of amyl alcohol the sulphuric acid solution was vigorously shaken with 25 ml. of chloroform. The resulting liquid was concentrated to a small volume under reduced pressure and then tested for the presence of histamine as follows:

(a) With a small amount of this solution Pauly's diazo reaction [1904] was carried out and a strong positive result was obtained. This very sensitive test, although not specific for histamine, being given also by other iminazole derivatives seemed, however, in this case to indicate the presence of histamine because other iminazole derivatives are insoluble in amyl alcohol.

(b) Another part of the solution obtained was subjected to the reaction of Zimmermann [1929]. This test, which is specific for histamine, also gave a strong positive result.

(c) To the main part of the liquid above described an excess of a concentrated solution of flavianic acid was added. After some time a pale yellow precipitate was formed. The m.p. was 256° . This precipitate was purified by repeated crystallizations from hot water. Ultimately, a fraction of a milligram of a yellow crystalline substance, insoluble in water, was obtained and this had m.p. 260° , not depressed on admixture with an authentic specimen of histamine diflavianate. Under the microscope the material appeared as bright yellow characteristic prisms showing great similarity with crystals of histamine diflavianate. On account of the strong positive result of the Zimmermann reaction in the fluid investigated and of the fact that the isolated flavianate showed many physical properties characteristic of histamine diflavianate it was assumed that the base present might indeed be histamine. It was of course necessary to obtain further evidence for that assumption.

Exp. 2. 34 l. of urine of several patients with signs of severe toxæmia of pregnancy and no histidinuria were worked up in the manner above described. The flavianate isolated had after repeated recrystallization m.p. 260° , not depressed on admixture with histamine diflavianate. Unfortunately, the yield of the material obtained was again very small, amounting only to a fraction of a milligram. Since the identification of the compound, so far carried out, was not at all satisfactory a further attempt was undertaken to procure a greater yield.

Exp. 3. This time it was decided to start from the urine of only two patients with signs of very severe toxæmia of pregnancy and no histidinuria at all in the hope that under these conditions histaminuria might be so considerable as to allow of histamine being isolated in larger amounts. 52 l. of urine from the two patients were treated in the way described, the only difference being that the amyl alcohol extracts were shaken with $N/10 HCl$ instead of $N/10 H_2SO_4$. The

liquid thus obtained was evaporated to dryness *in vacuo* after the traces of amyl alcohol had been removed by chloroform. A hydrochloride was obtained which showed strong positive Pauly and Zimmermann reactions. After recrystallization from hot alcohol prisms were obtained which under the microscope seemed very similar to crystals of histamine dihydrochloride. This hydrochloride was converted into a picrate which after several recrystallizations from hot water melted at 238–242° with decomposition and brown-black colouring. It showed no depression of M.P. when mixed with histamine dipicrate. This experiment yielded 2.7 mg. of the picrate which, like histamine dipicrate, was soluble in hot water and insoluble in ether. Under the microscope the crystals of the isolated picrate, consisting of yellow plates, closely resembled those of histamine dipicrate. It may be pointed out that histamine picrate as well as histamine flavianate give directly a strong positive diazo reaction without having been previously freed from picric or flavianic acid. Unfortunately, the amount of the picrate obtained was not large enough for a micro-analysis but X-ray-powder photographs of it were kindly taken by Dr C. A. Beevers, Chemistry Department, Kings Buildings, Edinburgh.

Photographs of substance I (histamine dipicrate) and substance II (picrate isolated from toxic pregnancy urine).

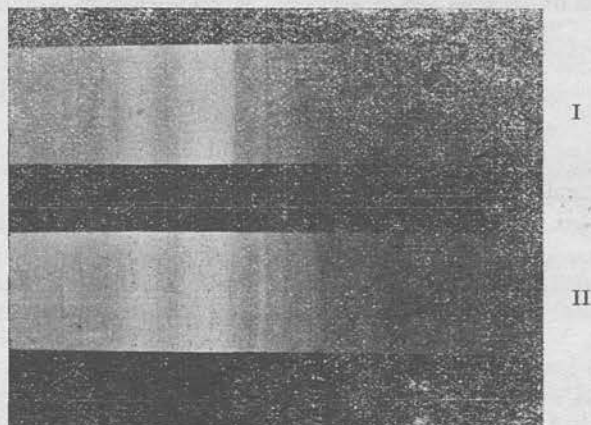


Fig. 1.

Dr Beevers makes the following observation on these photographs:

(1) General features identical but II has some extra lines (continuous parts due to glass).

(2) I and II have at least nearly the same crystal structure. What differences there are may be due to (a) impurities in II crystallizing in quite a different way; (b) imperfect crystallization of I resulting in certain lines becoming blurred. This is supported by the fact that photograph I is generally more blurred than II.

(3) Lines are very numerous, showing a large unit cell (probably large molecules).

(4) Photographs were taken with Cu K X-rays (Ni filter to remove K_{β}), $2\frac{3}{4}$ hr. exposure, 25 mA., 60 kW.).

Exp. 4. Whereas in the previous experiments urines of women suffering from pre-eclamptic toxæmia were used for the isolation of histamine this time the examination of the urine of a woman with hyperemesis gravidarum for the presence of histamine was undertaken.

The urinary output of 6 successive days (3000 ml.) of a woman in the 10th-12th weeks of pregnancy with distinct signs of hyperemesis gravidarum and with almost no histidinuria was the starting material. The urine was daily precipitated with $Zn(OH)_2$ and the precipitate worked up in the manner described above, with only one slight modification. After the decomposition of the zinc salt by H_2S a few ml. of ammonia solution were added to the liquid containing dilute H_2SO_4 in order to ensure complete precipitation of ZnS . The precipitate was allowed to settle overnight and was then worked up according to exp. 3. The hydrochloride obtained showed strong positive diazo and Zimmermann reactions. In presence of a little dilute H_2SO_4 it was converted into the flavianate by means of a concentrated solution of flavianic acid. The bright yellow flavianate showed a strong positive diazo reaction and had m.p. 258° . On several recrystallizations a pure substance was obtained with constant m.p. 260° , not depressed on admixture with an authentic specimen of histamine diflavianate. The yield of the purified material was 10.9 mg. (Found (Weiler): C, 39.70; H, 3.6; N, 13.4%; required for $C_5H_9N_3(C_{10}H_6N_2SO_8)_2$: C, 40.58; H, 2.86; N, 13.26%.)

Exp. 5. 39 l. of urine from four normal pregnant women with histidinuria were worked up as in exp. 4. The hydrochloric acid solution finally obtained, although showing a positive diazo reaction, did not yield any histamine diflavianate with flavianic acid. Obviously only traces of histamine were present.

It may be mentioned that Ackermann [1929] has isolated 0.9 mg. histamine dipicrate from 1000 l. of normal urine. Because of the very small amount of the compound he could not identify it accurately. — 1939

DISCUSSION

The experiments recorded above indicate that whereas normal pregnancy is characterized by histidinuria, in severe toxæmia of pregnancy the excretion of histamine in the urine seems to replace that of histidine. It should be stressed that the amount of histamine isolated certainly represents only a small part of the amount which may really be present in toxæmic pregnancy urine, since losses in the preparation cannot be avoided and, apart from that, not all the histamine can be recovered.

There is no doubt that the histamine appearing in toxæmia of pregnancy can only be derived from histidine which is normally present in large amounts throughout gestation. Histamine is presumably formed from histidine by decarboxylation. Werle [1936; 1937; 1938] has found that animal tissue, especially the kidneys, contain an enzyme which can alter histidine to histamine by decarboxylation. This enzyme which he called histidine decarboxylase appears to be more effective in absence than in presence of oxygen. But there is still another enzyme in the kidneys with an antagonistic action tending to the destruction of histamine. This enzyme, histaminase, first described and isolated by Best [1929; 1930; 1932; 1935] is effective only in the presence of oxygen.

Although no evidence has been advanced as yet as to the occurrence of histidine decarboxylase in the human body, the above-reported isolation of histamine from toxæmic pregnancy urine seems to suggest the presence of such an enzyme in man. For the conversion of histidine which is excreted in rather large amounts throughout normal pregnancy into histamine appearing in the urine of women with different manifestations of severe toxæmia of pregnancy can only be explained if the presence of a histidine decarboxylase in the human body is assumed.

Accordingly two factors seem to be responsible for the velocity of formation of histamine in histidine metabolism, namely, the activity of the histidine decarboxylase and that of histaminase. In a recent paper Werle [1940] reports that the activities of both enzymes are not only dependent on the presence or absence of oxygen but far more on the presence of various inactivators which regulate their action.

Thus the occurrence of histamine in the metabolism of pregnant women will finally be determined by the balance between histidine decarboxylase and histaminase.

The significance of the isolation of histamine from toxaemic pregnancy urine for the explanation of the pathogenesis and of the course of toxaemia of pregnancy will be discussed in another place.

SUMMARY

1. A chemical method has been described for isolation of histamine from the urine.
2. Four attempts have been made to isolate histamine from the urine of women with various manifestations of toxaemia of pregnancy. Whereas in the first two experiments only fractions of a milligram of histamine diflavinate have been isolated, exp. 3 yielded 2.7 mg. of histamine dipicrate from 32 l. of urine of two women with very severe toxaemia, identified by melting point, mixed melting point, the Zimmermann reaction and an X-ray photograph, in exp. 4 10.9 mg. histamine diflavinate have been isolated from 3000 ml. of urine of a woman with severe hyperemesis gravidarum and identified by a micro-analysis.
4. From 39 l. of normal pregnancy urine with normal histidine excretion the same method yielded no detectable quantity of histamine.
5. The origin of histamine and the factors responsible for its occurrence in toxic pregnancy are discussed.

I wish to express my gratitude to Prof. F. A. E. Crew and to Dr C. P. Stewart for kind hospitality. To Prof. R. W. Johnstone I am deeply indebted for the permission to use the clinical material from his Ward in the Simpson Memorial Maternity Hospital, Edinburgh. My thanks are also due to Prof. G. F. Marrian for his helpful criticism and advice.

REFERENCES

- Ackermann (1939). *Hoppe-Seyl. Z.* **259**, 32.
 Best (1929). *J. Physiol.* **67**, 256.
 — (1930). *J. Physiol.* **70**, 349.
 — (1932). *Biochem. J.* **26**, 1365.
 — (1935). *Biochem. J.* **29**, 315.
 Kapeller-Adler (1933). *Biochem. Z.* **264**, 131.
 — (1934). *Klin. Wschr.* **13**, 21.
 — (1940). *J. Obstet. Gynaec.* (in the Press).
 — & Boxer (1937). *Biochem. Z.* **293**, 207.
 — & Haas (1935). *Biochem. Z.* **280**, 232.
 — & Herrmann (1934). *Klin. Wschr.* **13**, 1220.
 — (1936). *Klin. Wschr.* **15**, 977.
 — (1936). *Klin. Wschr.* **15**, 1728.
 — & Schiller (1935). *Klin. Wschr.* **14**, 1790.
 Pauly (1904). *Hoppe-Seyl. Z.* **42**, 510.
 Werle (1936). *Biochem. Z.* **288**, 292.
 — (1937). *Biochem. Z.* **291**, 105.
 — (1938). *Biochem. Z.* **296**, 315.
 — (1940). *Biochem. Z.* **304**, 201.
 Zimmermann (1929). *Hoppe-Seyl. Z.* **186**, 260.

Addendum: 20th February 1941. Further identification of histamine isolated from the urine of patients with toxæmia of pregnancy.

Since the preceding paper went to press more histamine has been isolated from the urine of two toxæmic patients. 7700 ml of urine of a patient with hyperemesis gravidarum yielded 34.6 mg histamine diflavinate and 62.5 mg of the same salt were prepared from 8500 ml of urine of a woman suffering from serious pre-eclamptic toxæmia. In both cases the histamine diflavinate first obtained was purified and was then freed from flavanic acid by dilute hydrochloric acid and butylalcohol, thus giving a pure histamine hydrochloride. This salt was converted again into the diflavinate which had M.P. 262-263°, not depressed on admixture with an authentic specimen of histamine diflavinate. (Found (Weiler): C, 39.71; H, 3.22; N, 12.96%; required for $C_5H_9N_3(C_{10}H_6N_2SO_8)_2$ C, 40.58; H, 2.86; N, 13.26%. Prof. A. J. Clark, Department of Pharmacology of the University Edinburgh, kindly carried out biological tests with the preparations from both of these patients. In the case of the patient with hyperemesis a pure hydrochloride preparation was used. In the second case the hydrochloride contained traces of the flavinate. In tests on the guinea pig's ileum, the guinea pig's uterus and the rat's uterus the preparations from urine were identical ⁱⁿ pharmacological action with similar amounts of authentic histamine.



**Histidine Metabolism in Normal and Toxaemic Pregnancy.
The Excretion of Histidine in Normal Pregnancy
Urine and in the Urine of Patients with
Toxaemia of Pregnancy ***

BY

R. KAPPELLER-ADLER, Ph.D., Vienna

*From the Institute of Animal Genetics and from the Biochemical
Laboratory of the Royal Infirmary, Edinburgh.*

IN 1934 the writer described a simple reaction for demonstrating the presence of histidine in the urine, and the results obtained by investigating about 300 pregnant and non-pregnant women proved that this test may be used for the diagnosis of pregnancy.¹ By means of this method, slightly modified,² it was shown in 1936 that histidine is a normal constituent of the urine of women throughout the whole of pregnancy, that it appears in the urine at the very beginning of gestation and disappears from it after delivery or abortion.

Histidinuria is characteristic only of human gestation; histidine not being excreted during the pregnancy of animals.³ Further studies revealed the existence of a relation between the excretion of histidine and that of gonadotropic hormones in pregnancy.⁴

Since then systematic investigations of several thousand specimens of urine from pregnant and non-pregnant individuals have been carried out by the author and the following results have been obtained. Evidence was found suggesting that human pregnancy does not exist without a distinct and continuous excretion of histidine during the whole gestation period, the histidine reactions obtained ranging from a positive to a strong positive, and the quantitative figures ranging from 15 to 50 mgm. histidine per cent. The rate of histidine excretion seems to be at least partly dependent on the kind of food taken.⁵

Further it was observed that investigation of alkaline urines involves certain difficulties in testing for the presence of histi-

* The substance of this paper, and the subsequent one, was reported at a meeting of the Biochemical Society in Edinburgh, on June 8th, 1940:



dine but that these could be overcome by a preliminary treatment of such urines with N/10 KMnO_4 in sulphuric acid solution. When applying this modification to the investigation of alkaline urines of pregnancy almost 100 per cent accuracy can be obtained with this test in cases of normal pregnancy, whereas in 3 per cent of non-pregnant women positive results were reported by the author.² It should be pointed out, however, that positive results in the urine of the non-pregnant woman were only sporadically found, whereas the pregnant woman continuously excretes histidine throughout gestation. Moreover I believe that the colour reaction sometimes obtained in non-pregnancy urine may be caused, not by the presence of histidine in those urines, but by another still unknown compound, since the colour reaction in the urine of women who are not pregnant exhibits different qualities from that given by the urine of pregnant women.

and/
Neuweiler ~~the~~ Grimm⁶ using the histidine test on the urine of 247 women between the 5th and 9th months of pregnancy obtained positive results in all 247 cases. In the urine of pregnant women between the 1st and 4th months they obtained negative results in 2 cases, in one of which the urine was alkaline. These authors, therefore, claim to have obtained an accuracy of 99.3 per cent. Applying this test to the investigation of non-pregnant women, Neuweiler and Grimm observed a positive colour reaction in 15 per cent of the cases. It may, however, be mentioned that among the cases investigated were those of hydatidiform mole and of abortion in which the histidine reaction is usually positive. These authors also point to the transitory character of the positive result in women not pregnant.

With regard to the date of the first appearance of histidinuria in early pregnancy, it may be stated that a positive histidine reaction may be obtained as early as the 1st week after the first missed period, and sometimes even before a period has been missed. A positive histidine test is given as well in cases of ectopic pregnancy.

Attention may be drawn to one case which the author came across quite recently. On December 7th, 1940, a histidine test was made in the urine of a woman, 27 years of age, who had had her last period on November 10th. She started bleeding on November 19th, and had continued to bleed. She had pains in the right iliac region. The histidine reaction gave a weak positive result. On December 12th the patient was operated

upon, and ectopic gestation in the right Fallopian tube was found.

It may be mentioned that in early pregnancy the histidine reaction sometimes gives positive results sooner than the Aschheim-Zondek test or the Friedmann test. Neuweiler⁶ and Blaufuss⁷ report similar observations. Westberg⁸ found a positive histidine test in 7 cases of very early pregnancy (later clinically confirmed) whereas the Aschheim-Zondek test made at the same time gave negative results. In early pregnancy the histidine test seems to be more sensitive than the biological reactions.

In cases of threatened abortion the results of the histidine reaction vary from a weak positive to a positive. In one case of threatened abortion the histidine test gave a normal positive as did the Friedmann test, whereas the Aschheim-Zondek reaction was a weak positive. In another case of threatened abortion the histidine test was positive, the Aschheim-Zondek test giving a weak positive result.

In missed abortion only a weak positive histidine test is usually obtained.

Histidine tests in cases of hydatidiform mole are always positive. Histidinuria occurs also in cases of over-function of the anterior lobe of the pituitary gland in which the Aschheim-Zondek reaction is also positive. (Norpoth⁹, Kapeller-Adler and Boxer.¹⁰)

The conditions of histidine metabolism in normal pregnancy having been described it will be shown in this paper that in toxæmia of pregnancy a more or less distinct alteration in histidine metabolism is to be found.

Experimental procedure.

Qualitative and quantitative estimations of histidine were carried out with the modified reaction of Kapeller-Adler.² A brief description of this method may be given. It is always preferable to use 24-hours specimens of urine for the test, but as it was not always possible to obtain a whole day's output from the pregnant woman, the investigations were made on the urine that was first passed in the morning, having a specific gravity of about 1015 to 1025.

Reagents.

(a) Bromine reagent: 5 c.c. bromine and 500 c.c. glacial acetic acid were diluted with 1,000 c.c. distilled water, and the mixture stored in a brown glass bottle.

(b) A mixture of ammonia and ammonium carbonate: 400 c.c. ammonia solution, specific gravity 0.880, was mixed with 200 c.c. of a 10 per cent ammonium carbonate solution.

(c) Potassium iodide starch paper.

(d) N/10 potassium permanganate solution.

(e) 10 per cent sulphuric acid.

Technique.

The urine is filtered if necessary, and then tested with litmus paper. Acid urines can be directly tested for histidine, but alkaline urines must first be treated with potassium permanganate in sulphuric acid solution.

Treatment of acid urines.

To 5 c.c. of acid urine sufficient bromine reagent is added to change the original colour of the urine to orange-red, then to orange-yellow and finally to pale yellow. The latter colour indicates the necessary slight excess of bromine. This excess is tested for by potassium iodide starch paper; the fluid is then left for about 5 minutes during which the excess of bromine disappears, as confirmed by dropping it on the potassium iodide starch paper; 0.5 c.c. of the mixture of ammonia and ammonium carbonate solution are then added to the urine, now bromine-free. This fluid which shows a pH_4 is shaken and the test tube containing it is placed in a beaker of boiling water for 2 or 3 minutes. In urines containing histidine a red or a reddish-violet colour appears. After some time the fluid deposits brown-black amorphous flakes of the dye. Urines free of histidine do not change their colour.

Treatment of alkaline urines.

To 5 c.c. of urine 2 c.c. 10 per cent sulphuric acid and sufficient N/10 potassium permanganate are added to change the urine to a pink colour, which will persist for half to one minute. The urine is allowed to stand for a few minutes until it becomes clear and almost colourless, when a few drops of the bromine reagent are added until the fluid becomes pale yellow. The urine should then be tested with potassium iodide starch paper for a slight excess of bromine. The fluid is left for 5 minutes during which time the excess of bromine disappears. One c.c. of the mixture of ammonia and ammonium carbonate are added, the fluid (pH_4) shaken, and placed in a beaker with

boiling water for 2 or 3 minutes. The urines containing histidine become red, while the histidine-free urines remain yellow. The importance of the preliminary treatment of alkaline urines with N/10 KMnO_4 in sulphuric acid solution for the achievement of satisfactory results may be illustrated by the fact that in many alkaline urines of pregnant women negative histidine tests were obtained, whereas the same urines showed positive reactions when treated with N/10 KMnO_4 before the determination of histidine.

For the *quantitative estimation* of histidine the urine must be filtered, after which the test is performed, as described above, according to the reaction of the urine on litmus paper. The quantitative measurement is carried out by means either of the colorimeter, Klett, or of the Stufen-photometer Zeiss,¹¹ or with the Spekker photoelectric absorptiometer. It is necessary to make quick readings before the separation of the dye in flakes begins to take place.

As already mentioned, the colour reaction, which is sometimes obtained with the urine of women who are not pregnant, differs from the ordinary positive reaction in healthy pregnant patients in that a persistently clear violet-blue colour is produced, whereas in the reaction of normal pregnancy a deep red or reddish-violet colour is produced in which brownish or black flakes of the dye are soon deposited.

Finally, it should be stressed that reactions with only a faint pink colour are to be considered negative.

Investigations of cases of toxæmia of pregnancy.

The 59 cases to be described fall into 4 groups according to the symptoms exhibited. (Paras. I to IV, pages 9 to 14.)

I. CASES OF HYPEREMESIS GRAVIDARUM

Symptoms: fast pulse-rate, low blood-pressure, sometimes albuminuria. Five patients were investigated.

All data obtained are summarized in Para. I.

The patients of this group were between the 8th and 14th weeks of pregnancy. All women exhibited a rather low blood-pressure, and sometimes had a pulse-rate over 100. Special attention may be drawn to patient No. 4, who had severe sickness from the 5th week and who had a very low blood-pressure. During the early months of her first pregnancy she had also suffered from excessive vomiting.

The histidine excretion in the urine of patient No. 1 was below the normal level, whereas in the remaining cases normal positive results were achieved.

II. CASES OF MILD PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA

Symptoms: Traces of albumin in the urine, slight rise in blood-pressure, oedema, headache, and heartburn. Twenty-six patients were investigated.

The patients of this group exhibited only a few symptoms of toxæmia of pregnancy. Slight oedema and sporadic headache could be noted, the blood-pressure was not generally high, and either albumin was absent from the urine or there were only traces thereof. Some of the patients had suffered from morning sickness in the first months of pregnancy; 17 of the 26 were primigravidae. Most of the patients were in the 8th or 9th months of pregnancy when the investigations were carried out. In the majority of cases the histidine excretion proved to be normal. The amount of histidine found in the urine of 3 patients (Nos. 3, 11, 12) was subnormal, and in 3 other cases (Nos. 2, 4, 5) only traces of histidine were recovered. Some cases (Nos. 2, 20, 25, 26) are of interest in that on one day only traces of histidine were excreted by the patients, to be followed on the next day by a rise to the normal level.

Analysing the findings in this group as a whole, one observes that the deviation of the histidine excretion from the normal level of pregnancy is slight.

III. CASES OF MODERATE PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA.

Symptoms: Albuminuria, high blood-pressure, oedema. Fourteen patients were investigated.

In the cases investigated hypertension was mostly persistent, albumin was always to be found in the urine and nearly all patients showed oedema. Nine women were primigravidae. The patients were in the 8th or 9th months of pregnancy when they were admitted to the hospital. Two of the women exhibited visual disturbances (Nos. 2, 11), and 3 suffered from breathlessness on exertion (Nos. 10, 11, 14). One patient (No. 9) complained of epigastric discomfort. There was one twin pregnancy (No. 13) and one stillbirth (No. 12). Two of the patients (Nos. 3, 7) had had morning sickness during the first months of pregnancy. In all the cases of this group the histidine excretion was below the normal level, and in several

only traces of histidine were found. In one case (No. 1) the Aschheim-Zondek reaction was carried out and gave a positive result, whereas only traces of histidine were found.

Case No. 12 may particularly be discussed. This patient showed only mild clinical signs of toxæmic pregnancy so that it appeared to be doubtful whether she was a case of pre-eclamptic toxæmia. But her histidine excretion in the urine, investigated daily for a fortnight, was extremely low and suggested that it might be a case of serious pre-eclamptic toxæmia. As will be shown later, the urine of this patient contained, in fact, a fairly high amount of a toxic compound. It is noteworthy that this woman had a stillbirth, the child being born slightly macerated.

Case No. 14 is also of some interest. This patient, who became increasingly dyspnoeic from the 6th month of pregnancy, did hardly show any clinical signs of toxæmic pregnancy. Her histidinuria pointed, however, to the likelihood of a toxæmia of pregnancy. As an organic lesion of the heart could be excluded by a thorough examination, the dyspnoea of the patient was presumably due to toxæmic conditions in pregnancy.

IV. CASES OF SEVERE PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA

Symptoms: Hypertension and albuminuria persisting, oedema. Fourteen patients were investigated.

Para. IV shows that 9 out of 14 patients were primigravidae and one was pregnant for the 6th time. In all the patients a marked and persistent hypertension was observed, large amounts of albumin were found in the urine, and the majority complained of oedema. The patient pregnant for the 6th time (No. 3) had also epigastric pain and vomiting, severe cough, breathlessness and cyanosis. She had had renal trouble 6 and 4 years prior to this pregnancy. Two women with severe toxæmia (Nos. 10, 11) did not give any evidence of oedema. Four patients (Nos. 5, 10, 12, 14) suffered from severe headache, 2 (Nos. 5, 14) exhibited ocular disturbances and several were troubled by sickness (Nos. 3, 8, 10, 12, 14). There was one stillbirth (No. 1), one miscarriage (No. 9), one twin pregnancy (No. 2), 7 cases of premature delivery (Nos. 3, 5, 8, 10, 11, 13, 14) and 4 cases of artificial delivery (Nos. 10, 11, 13, 14). In case No. 5 there were post-partum convulsions in both the mother and the child. Patient No. 14 developed eclampsia, and that was the reason for the induced delivery. Patient No. 10 had to undergo an artificial delivery on account

of cardiac failure. Patient No. 11 developed thrombosis, hemiplegia, and aphasia, and labour had to be induced for that reason. Four patients (Nos. 3, 5, 10, 14) gave a history of toxaemic symptoms in their preceding pregnancies.

It is to be noted that most of the patients of this group had to attend the hospital at an earlier stage of pregnancy than the patients in groups II and III: namely between the 7th and 8th months of gestation.

In all cases in this group histidine was absent, or only traces of it were found in the urinary tests made at frequent intervals over a period of weeks. The absence of histidine excretion was always associated with considerable hypertension and marked albuminuria. So constant were these findings that a marked diminution in histidine excretion, or absence of histidinuria, can be used as a diagnostic sign of severe toxaemia of pregnancy.

It is of interest that the Aschheim-Zondek reaction* in 6 cases (Nos. 2, 3, 8, 9, 10, 11) gave either a positive or a weak positive result. A negative Aschheim-Zondek reaction was not obtained in any case, which indicates that even under toxaemic conditions gonadotropic hormones continue to be excreted, although sometimes at a reduced level. The reaction of histidine made simultaneously was mostly negative.

It will be demonstrated later that in cases of severe toxaemia of pregnancy changes in the histidine metabolism take place which explains why histidine does not appear in the urine. The lack of histidine in such cases is generally associated with severe albuminuria and other symptoms of profound toxaemia, and can itself be regarded as a salient feature of the condition. / 6

It may be pointed out that improvement in the toxaemia of pregnancy is always accompanied by an increase in histidine elimination, so that the reappearance of histidine in the urine of patients with toxaemic symptoms may be considered a favourable sign.

Summary.

Histidine is a constituent of the urine throughout normal human pregnancy, the excreted amounts ranging between 15 and 50 mgm. per cent. Histidinuria is not appreciably affected in cases of mild pre-eclamptic toxaemia, but is considerably

* The author desires to thank Miss Mairi Mackay, Institute of Animal Genetics, Edinburgh, for numerous Aschheim-Zondek reactions carefully carried out by her.

diminished in patients with serious symptoms of pre-eclamptic toxæmia. In cases of severe pre-eclamptic toxæmia histidine is not to be found in the urine, or only traces are found. So constant are these findings that a marked diminution, or total absence of histidine excretion can be used as a diagnostic sign of severe toxæmia of pregnancy.

I. CASES OF HYPEREMESIS GRAVIDARUM

Patient No. 1. 0-para, 10th week of pregnancy; blood-pressure, 120/80; pulse-rate, never above 90; vomiting, from week before admission; albumin, +, trace, 0, trace; histidine mgm. per cent, 5, 7, trace, 8, 3, trace, trace; one miscarriage 18 months previously.

Patient No. 2. 0-para, 10th to 12th weeks of pregnancy; blood-pressure, 120/100, 110/60; pulse-rate, 88, 100, 88, 88, 80; albumin, + + +, + +, + +, 0, trace, trace; histidine mgm. per cent, 15, 20, 12, 20, 20, 19, 22, 20, 20, 20, 15, 20, 18.

Patient No. 3. 1-para; 12th to 14th weeks of pregnancy; blood-pressure, 118/70; pulse-rate, 72, 80, 80, 84; vomiting, from 10 days before admission; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 20, 15, 16, 20, 22, 12, 18.

Patient No. 4. 1-para; 8th to 10th weeks of pregnancy; blood-pressure, 100/70, 98/65, 80/55, 90/70, 95/75; pulse-rate, 80, 88, 90, 92, 80, 76, 96, 88, 84; severe sickness from 5th week of pregnancy; albumin, 0, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 10, 15, 10, 30, 28, 12, 30. First pregnancy 10 years ago with excessive vomiting in early pregnancy as complication.

Patient No. 5. 3-para; 8th week of pregnancy; blood-pressure, 110/80; pulse-rate, 88, 82, 104, 98, 88, 88, 84; sickness from 6th week; albumin, trace, 0, 0; histidine mgm. per cent, trace, 20, 12, 15, 20, 16. First pregnancy, 1934, duration, 7 months. Hyperemesis as complication. Second pregnancy, 1935, duration 6½ months. Cause of abortion unknown. Third and 4th pregnancies were normal.

II. CASES OF MILD PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA

Patient No. 1. 0-para; 8th month of pregnancy; blood pressure, 158/110; slight oedema; albumin, 0, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 40, 30, 40, 40, 32.

Patient No. 2. 3-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 180/80; 110/60; oedema, feet and ankles, from 5th month; headache, when admitted; visual disturbances, occasionally black spots; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, trace, trace, 30.

Patient No. 3. 2-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 170/90, 110/80; oedema, ankles for last 2 months; headache, during early months; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 15, 10, 10; complained of fatigue and dyspnoea on exertion. Did not feel well throughout pregnancy.

Patient No. 4. 4-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure,

140-150/80; oedema, absent; headache, absent; albumin, 0, +, 0; histidine mgm. per cent, trace, trace.

Patient No. 5. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/80, 120/75; oedema, ankles, and face for the last 2 months; albumin, 0, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 10, trace, trace, 6.

Patient No. 6. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 145/90, 130/80, 130/80; oedema, absent; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 20, 14, 15.

Patient No. 7. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 150/80; oedema, slight; headache, slight; sickness during the first 3 months; albumin, 0, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 28, 25, 22, 20, 25; 25, 24.

Patient No. 8. 0-para, 9th month of pregnancy; blood-pressure, 100/60; oedema, slight; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 26, 20, 24, 26, 20, 25.

Patient No. 9. 4-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 120/80; oedema, feet; albumin, 0, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 38, 35, 32.

Patient No. 10. 0-para; 7th to 8th months of pregnancy; blood-pressure, 160/100; oedema, ankles; headache, slight; albumin, trace, trace; histidine mgm. per cent, 20, 22, 18.

Patient No. 11. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/120, 120/80; oedema, ankles, face, hands; albumin, +, trace, 0; 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 8, 10, 10, trace, 8.

Patient No. 12. 0-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 145/80, 130/70, 140/60, 160/90; oedema, ankles, from the 6th month; headache, +; albumin, +, trace, trace, +; histidine mgm. per cent, 8, 10, 12, 10, 13.

Patient No. 13. 1-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 130/80, 130/80, 130/90; oedema, feet; morning sickness in the first months; albumin, trace, trace, +; histidine mgm. per cent, 28, 26.

Patient No. 14. 6-para; 7th to 8th months of pregnancy; blood-pressure, 150/100, 120/70; puffiness round eyes; albumin, trace, trace, trace, trace; histidine mgm. per cent, 35, 33, 25, 20, 30, 20, 20, 25.

Patient No. 15. 1-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 150/90; oedema, feet and ankles; visual disturbance, occasionally black spots; albumin, trace, trace, trace, trace, trace, trace; histidine mgm. per cent, 39, 32, 36, 39, 38; twin pregnancy.

Patient No. 16. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 130/80; oedema, feet, hands, face; albumin, trace, 0; histidine mgm. per cent, 12, 26, 25; Aschheim-Zondek reaction, weak positive.

Patient No. 17. 0-para; 7th month of pregnancy; blood-pressure, 140/80; 120/70; oedema, feet and legs from the 5th month; albumin, trace, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 25, 30, 29, 28, 29, 31, 25, 25, 31, 29, 24.

Patient No. 18. 1-para; blood-pressure, 160/100, 170/110, 160/100;

nausea; albumin, 0, 0, 0; histidine mgm. per cent, 30, 20, 34, 31, 25, 31, 26, 34, 42, 40, 37, 30.

Patient No. 19. Blood-pressure, rising slightly; albumin, trace, trace, histidine mgm. per cent, 20, 18, 15.

Patient No. 20. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/80, 120/65; oedema, ankles; slight morning sickness in the first 3 months; albumin, trace, trace, trace; histidine mgm. per cent, 10, 18, trace, 24.

Patient No. 21. o-para; 5th month of pregnancy; blood-pressure, 130/75; vomiting, once, 4 days before admission; albumin, 0, trace; histidine mgm. per cent, 14, 20, 16, 12, 30, 30, 28, 24.

Patient No. 22. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 125/85, 180/130, 130/95; oedema, ankles, gradually increasing; albumin, +, +, trace; histidine mgm. per cent, 16, 10.

Patient No. 23. o-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 120/90, 120/80; albumin, +, +; histidine mgm. per cent, 40, 45.

Patient No. 24. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 155/105; albumin, 0, 0; histidine mgm. per cent, 18, 16.

Patient No. 25. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 130-140/80-100; oedema, slight, face, hands, legs; albumin, +, +, +, +, +, +, +; histidine mgm. per cent, trace, 25, 19, 25, 22, 30, 18, 22, trace, 25, 20, 22, 25, 30, 26, 20, 25, 20, 22, 15.

Patient No. 26. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 130-140/100-105; severe sickness absent during first 5 months; albumin, trace, trace, trace; histidine mgm. per cent, 0, 18, 5, 22, trace, 26, 8, 22, 5, 16, trace, 20, 18, 22, trace, 22, 5, 22, 15, 18, 0, 16.

III. CASES OF MODERATE PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA

Patient No. 1. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 180/120, 140/100; oedema, ankles, 2 months before admission; some vomiting; albumin, +, +, ++; histidine mgm. per cent, 10, trace, trace, 11, trace, trace, trace, 4, trace, trace; Aschheim-Zondek reaction, positive.

Patient No. 2. 4-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 180-200/120-140; 160/100; 160/100; oedema, feet and ankles; black spots in face and eyes; albumin, +, ++, ++++, ++; histidine mgm. per cent, 5, 4, trace, 5, 8, 4.

Patient No. 3. o-para; 7th month of pregnancy; blood-pressure, 140/80; 140/80; oedema, feet, last 4 weeks before admission; swelling of the vulva, +++; headache in the 4th and 5th months; morning sickness during the first 3 months; albumin, +, ++, ++, ++; histidine mgm. per cent, 6, 5, 5, trace, trace, 7, 6, trace, trace, trace, trace, trace, 6, 9, trace, trace.

Patient No. 4. o-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 140/90, 120/80, 145/100, 130/100; oedema, ankles, 2 months before admission; albumin, 0, trace, +, +; histidine mgm. per cent, 10, 10, 12, 9, 7, 12, 10, trace, 5, 7.

Patient No. 5. 2-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 125/75; albumin, +, +; histidine mgm. per cent, trace, trace.

Patient No. 6. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/90, 140/90; some oedema of ankles; albumin, ++, +++, ++, ++; histidine mgm. per cent, 12, trace, trace, trace, 6, 6, trace, 15, 10, 8, trace, 6; heartburn, ++.

Patient No. 7. 0-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 146/110, 140/90; vomiting, during first 4 months; albumin, +++, ++, +, +, +, +, +, +; histidine mgm. per cent, 8, 7, 9, trace, 5, trace.

Patient No. 8. 0-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 140/100, 140/90; oedema, face, ankles, legs; albumin, ++, trace, trace; histidine mgm. per cent, 12, trace, trace, 12.

Patient No. 9. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 155/100, 145/100; oedema, +++, ankles, face, hands; nausea; albumin, trace, trace, histidine mgm. per cent, 5, 9; epigastric discomfort.

Patient No. 10. 4-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 120/70, 110/80; oedema, +++, ankles, abdominal wall; albumin, trace, trace; histidine mgm. per cent trace, trace. Breathlessness on exertion from the 6th month.

Patient No. 11. 3-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 130/80, 150/90; oedema, ankles; severe blurring of vision; albumin, trace, trace; histidine mgm. per cent, 10, trace; 1 miscarriage; frequent attacks of epistaxis; breathlessness on exertion.

Patient No. 12. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140-150/90-110; albumin, trace, ++, +, +, ++, ++; histidine mgm. per cent, 15, 12, 10, trace, trace, 6, 7, 3, 5, 5, 5, 0; stillbirth, child slightly macerated.

Patient No. 13. 4-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/100; oedema, feet, ankles; albumin, +++, +++; histidine mgm. per cent, trace, trace; twin pregnancy.

Patient No. 14. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 140/90, 120/90; oedema, ankles; albumin, +, trace, +, ++; histidine mgm. per cent, 15, trace, 10, trace, 10, trace. Increasingly dyspnoeic from the 6th month, only on exertion.

IV. CASES OF SEVERE PRE-ECLAMPTIC TOXAEMIA

Patient No. 1. 3-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 145/95; albumin, ++, ++, ++; histidine mgm. per cent, trace, trace, trace, trace; stillbirth.

Patient No. 2. 0-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure, 155/110; oedema, for last 6 weeks; albumin, +++, +++; histidine mgm. per cent, 5, 0; Aschheim-Zondek reaction, positive; twin pregnancy.

Patient No. 3. 6-para; 7th month of pregnancy; blood-pressure, 180/120, 180/120; oedema, ankles, legs, sacrum, for last 4 months; vomiting, +; albumin, ++, ++, ++, ++; histidine mgm. per cent, 5, trace, 0, trace. Kidney troubles 6 and 4 years ago. This pregnancy

epigastric pain, breathlessness, cyanosis; Aschheim-Zondek reaction, +; premature delivery.

Patient No. 4. o-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 160/90, 130/80; oedema, ++, ankles, feet; albumin, trace, trace, trace; histidine mgm. per cent, 8, 10, 7, 7, trace, 8, trace, 8, trace, trace, 5, 6, 8, 8, 10, 10, 6, trace, 5, 8.

Patient No. 5. o-para; 6th to 7th months of pregnancy; blood-pressure, 150/110, 140/110; slight oedema in ankles and face. Headache during the 4th month of pregnancy; subjective eye disturbances; albumin, ++, +++, ++, ++; histidine mgm. per cent, 0, 0, trace, 0, 5, trace, trace, 0, trace, 0, 5, 7, trace, 0; 1 miscarriage; premature birth. After delivery patient and child had convulsions.

Patient No. 6. o-para; 8th to 9th months of pregnancy; blood-pressure, 140/100, 120/80, 145/100; slight oedema; albumin, ++, +++, +++, +++, +++; histidine mgm. per cent, trace, trace, 0, trace, trace, trace, 0, 0, trace, trace, trace.

Patient No. 7. o-para; 8th month of pregnancy, blood-pressure, 180/120, 140/100, 140/100; oedema, ++; albumin, +++, +++, +++; histidine mgm. per cent, 0, 0, trace, 0, trace, 0, 0, 0, trace, trace, trace, 0, trace, 0, 0, trace.

Patient No. 8. 1-para; 7th to 8th months of pregnancy; blood-pressure, 150/110, 196/110; oedema, ankles; vomiting during the 2nd month; albumin, +++, +++, +++, ++, +++; histidine mgm. per cent, 0, 0, 0, trace, trace, trace, 0, 0, 0, 0; Aschheim-Zondek reaction, weak +; premature birth.

Patient No. 9. o-para; 7th month of pregnancy; blood-pressure, 210/100, 190/120; oedema, feet, face; albumin, +++, +++, +++; histidine mgm. per cent, 10, 5, 7, 6, trace, 5, trace, trace, 0, 0, 0; Aschheim-Zondek reaction, weak +; 6 months' foetus, dead.

Patient No. 10. 1-para; 5th month of pregnancy; blood-pressure, 170/120, 160/100, 140/90, 140/90, 120/80, 140/100, 180/120; headache, +; sometimes feeling of nausea; albumin, trace, trace, trace, ++, +++, +++, +++, +++, +++, ++, +++; histidine mgm. per cent, 10, 6, 5, 7, 6, 0, trace, 0, trace, trace, trace, 0, 0, trace, 0, 0, 0, 0, 0, 0, trace, trace, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 5, trace, 5, 10, 0, 15, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, trace, trace, 0, 0, 0, 0, trace, trace, 0, 5, 7, 7, 0, 0, trace, 0, 0, 0; Aschheim-Zondek reaction, weak +. Two years ago premature birth following pre-eclamptic toxæmia; child was alive. One year ago abdominal hysterotomy because of a severe pre-eclamptic toxæmia; blood-pressure, 220/140; albumin +++. Miscarriage in the 5th month. This pregnancy, premature artificial delivery; heart failure.

Patient No. 11. o-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 150/100, 190/110, 130/70, 170/100, 190/130, 220/130, 180/110; oedema, absent; albumin, +, +, ++, +++, ++; histidine mgm. per cent, 0, 0, trace, trace, 0. Aschheim-Zondek reaction, extremely weak +. Thrombosis, hemiplegia, aphasia; artificial delivery, premature.

Patient No. 12. o-para; 9th month of pregnancy; blood-pressure,

170/100, 140/85, 150/100, 140/100, 150/85; oedema, ankles, ++. Headache during the first 2 to 3 weeks. Slight giddiness and faintness. Morning sickness during the first 3 months. Albumin, + + +, solid, + + +, + + +, + + +; histidine mgm. per cent, trace, o, o, o. General lassitude and tiredness.

Patient No. 13. o-para; 8th month of pregnancy; blood-pressure, 160/110, 170/120, 180/130, 220/160, 200/160; oedema, ankles; albumin, + + +, + +, + +, + + + +; histidine mgm. per cent, trace, o, o; premature birth; classical Caesarean section.

Patient No. 14. 2-para; 7th to 8th months of pregnancy; blood-pressure, 180/100, 140/90, 160/100, 175/110; oedema, + +, feet, hands, face. Severe headache; blurring of vision. Morning sickness during first 3 months. Albumin, solid, + + + +, solid, solid; histidine mgm. per cent, o, o, o; 2 miscarriages. This pregnancy, in the 3rd month, threatened abortion cleared up. Has not felt well during all the pregnancy; patient developed fits; delivery induced; premature child.

REFERENCES.

1. Kapeller-Adler, R. *Klin. Woch.*, 1934, xiii, 21.
2. Kapeller-Adler, R. *Klin. Woch.*, 1936, xv, 1728.
3. Kapeller-Adler, R., and H. Hermann. *Klin. Woch.*, 1934, xiii, 1220.
4. Kapeller-Adler, R., and F. Haas. *Bioch. Zeits.*, 1935, cclxxx, 232.
5. Kapeller-Adler, R., and W. Schiller. *Klin. Woch.*, 1935, xiv, 1790.
6. Neuweiler, W., and W. Grimm. *Klin. Woch.*, 1940, xix, 155.
7. Blaufuss. Diss. Univ. Bonn, 1935.
8. Hedstroem, V., and V. Westberg. *Nord Med. Tidsk.*, 1938, xv, 173.
9. Norpoth, L. *Klin. Woch.*, 1937, xvi, 96.
10. Kapeller-Adler, R., and G. Boxer. *Bioch. Zeits.*, 1937, ccxciii, 207.
11. Kapeller-Adler, R. *Bioch. Zeits.*, 1934, cclxxi, 206.

The significance of the Isolation of Histamine from the
Urine in the Toxaemia of Pregnancy

BY

R. KAPPELLER-ADLER, Ph.D., Vienna

*From the Institute of Animal Genetics, and from the Bio-
chemical Laboratory of the Royal Infirmary,
Edinburgh*

As the result of the findings obtained in the course of the investigation described in the preceding paper, the conclusion was drawn that toxaemic pregnancy is associated with abnormal histidine metabolism. It appeared to be possible that in severe toxaemia the histidine, instead of being excreted as such, was being transformed into some other compound, probably one of pharmacological activity.

Considering the chemical structure of histidine, the possibility of a transformation of this inactive substance into the very active substance histamine became obvious. Therefore, repeated attempts were made to detect this active compound in toxaemic pregnancy urine. The detailed description of these attempts is given in a paper at present in the press.¹ The results of these experiments may be summarized as follows. Four attempts have been made to demonstrate the isolation of histamine from the urine of women with various signs of toxaemia of pregnancy. In the first two experiments only fractions of a milligram of histamine diflavinate were isolated from 23 litres of urine from patients with severe pre-eclamptic toxaemia. A third attempt yielded 2.7 mgm. of histamine dipicrate out of 32 litres of urine from 2 women with very severe pre-eclamptic toxaemia (compare Para. IV, Nos. 10 and 11 of the preceding paper). In the fourth experiment with a modified technique 10.9 mgm. histamine diflavinate were isolated from 3 litres of urine from a woman suffering from severe hyperemesis gravidarum (compare Para. I, No. 1). From 39 litres of normal pregnancy urine with normal histidine excretion a detectable quantity of histamine could not be obtained. Since then two further attempts at isolation of histamine have been made with the modified technique. In a second case of hyperemesis gravidarum 34.6

mgm. histamine diflavianate were isolated out of 7,700 c.c. of urine. The second experiment was carried out on the urine of a woman with serious pre-eclamptic toxæmia, with the result that 62.5 mgm. histamine diflavianate were prepared from 8,500 c.c. of urine (compare Para. III, No. 12). It may be recalled that this patient exhibited only very mild signs of toxæmia of pregnancy, but demonstrated either a very low histidine excretion or entire absence thereof, and that her pregnancy terminated in a stillbirth, the child being slightly macerated.

del /

There is no doubt that the histamine isolated from urine in cases of ~~the~~ toxæmia of pregnancy can have only been derived from histidine which is normally present in large amounts throughout pregnancy. The way in which histamine may be formed from histidine is extensively discussed in the paper mentioned above.¹ Two factors seem to be responsible for the rapidity of formation of histamine in the histidine metabolism, namely, the activity of two enzymes, (a) histidine decarboxylase, (b) histaminase. Animal tissues, especially the kidneys, contain both enzymes. Whereas the histidine decarboxylase, which can alter histidine to histamine, appears to be more effective in an atmosphere lacking oxygen than in the presence of oxygen (Werle²), the histaminase, an enzyme tending to the destruction of histamine, works only if oxygen is present (Best³). Recently Werle⁴ reports that the activity of both enzymes is not only dependent on atmospheric conditions but also on the presence of various inactivators which regulate their action. It may be suggested that the occurrence of histamine in the metabolism of pregnant women will finally be determined by the balance in the activity of the histidine decarboxylase and the histaminase.

The occurrence of histamine in the urine in toxæmia of pregnancy having been proved, the possible significance of that finding for the pathogenesis and course of that disease may be discussed.

First of all it must be pointed out that the term toxæmia of pregnancy should be retained, since, for the first time, a real toxin has been isolated from the urine of toxæmic pregnancy. This is contrary to certain authors, notably Irving,⁵ Seitz⁶ and v. Jaschke,⁷ who reject the assumption of a toxin as the cause of eclampsia. The fact that histamine has been isolated from the urine of patients suffering from pre-eclamptic toxæmia, as well as from the urine of women suffering from hyperemesis gravidarum, suggests that pre-eclamptic and eclamptic toxæmia, tox-

æmic vomiting and the premature separation of the placenta may not represent independent diseases, but may form only different manifestations of the same disease, probably of an intoxication by histamine. Although evidence has not yet been advanced as to the occurrence of histamine in normal pregnancy urine I am inclined to think that very small amounts of histamine may also be formed in the metabolism of normal pregnancy, and that the less pronounced symptoms like headache, morning sickness and dyspepsia occurring in nearly every normal pregnancy may indicate slight intoxication by histamine.

A comparison of the clinical picture in the various manifestations and degrees of toxæmia of pregnancy, together with the conditions produced by experimental intoxication by histamine, reveals numerous points in which there is a suggestive similarity. Injections of histamine in man produce a characteristic sequence of events, the intensity of which can be greatly reduced by giving the injections slowly and gradually. The changes produced are a slight acceleration of the pulse-rate, a slight fall in arterial pressure and a slight rise in the temperature—all of which may be observed in severe hyperemesis gravidarum. In addition a feeling of constriction in the head and headache are experienced, sometimes accompanied by visual disturbances (Best and McHenry⁸). Larger doses produce intolerable headache, vomiting and unconsciousness. Cyanosis and difficulty in breathing, particularly inspiratory dyspnoea, have also been recorded, and Kehrer⁹ observed convulsions. Histamine injections also produce oedema, which is a common sign of pre-eclamptic toxæmia and eclampsia.

Histamine is also stated to increase the excitability of the sympathetic nervous system, and many obstetricians (e.g. Stroganoff,¹⁰ Stander¹¹) emphasize the presence of this feature in pregnancy toxæmia, particularly in hyperemesis.

In addition certain changes in the blood are common to both pregnancy toxæmia and histamine poisoning. Cyanosis in the latter has been mentioned, and anoxæmia is a recognized feature of pre-eclamptic toxæmia and eclampsia. In histamine poisoning the CO₂-combining power is lower, hyperglycaemia occurs, along with a decrease in the hepatic glycogen, and the sodium content and calcium content of the blood are diminished. All these changes have been claimed to occur in pre-eclamptic toxæmia and eclampsia, although it is notorious that the findings of different observers conflict in some measure.

Finally the pathological changes in various organs particu-

larly in the liver and kidneys in experimental intoxication with histamine so closely resemble those in toxæmic pregnancy that some authors (Hofbauer,¹² Heinlein¹³) conceived of histamine as the causative factor of eclampsia for that reason alone.

Whereas the decreased blood-pressure in cases of hyperemesis gravidarum is in accord with the known effect of histamine in lowering the blood-pressure, the hypertension characteristic of pre-eclamptic toxæmia appears at first glance to be at variance with it. It may, however, be recalled that histamine causes renal impairment and persistent albuminuria are mostly observed together with hypertension in cases of severe pre-eclamptic toxæmia. Since serious renal disturbances such as glomerular and tubular lesions follow histamine injections, it appears likely that the primary cause of hypertension in pre-eclamptic toxæmia may be renal impairment. This being granted, the rise in blood-pressure may occur as a protective measure, since it would seem to indicate an attempt on the part of the organism to maintain an adequate filtration pressure in the glomeruli. Thus, hypertension in pregnancy may provide, by its early appearance, a very important warning sign indicating the activity of histamine in the pregnant body.

A review of the literature as regards the aetiology of toxæmic pregnancy shows that, as already mentioned, some authors have considered histamine as the causative factor of eclampsia. Hofbauer¹² first suggested that histamine may be the cause of premature separation of the normally implanted placenta. He was, however, not able to give any convincing evidence with respect to the occurrence and the origin of histamine in toxæmia of pregnancy. Reference is also made by Revoltella¹⁴ to the occurrence of histamine in the blood, urine and various organs of patients with eclampsia and pre-eclampsia, but he, also, did not advance further confirmation of this opinion. He assumed that histamine is either formed by the foetus or by the placenta itself, or derived from the intestine. As already mentioned, Heinlein also believed histamine to be the cause of eclampsia, but, again, he did not adduce any evidence in support of his belief.

An observation made by Edlbacher¹⁵ should be mentioned here. This author reports that, according to his experiments, histidine, as well as arginine and cysteine, have been found to cause a complete inhibition of the customary action of histamine. In view of this observation it appears likely that the histidine occurring in larger amounts in normal pregnancy

may have a protective effect against histamine which may appear in the metabolism as an intermediate product. In cases of severe toxæmia, however, in which histidinuria is absent, that protective effect of histidine against histamine may be absent. In this connexion reference may be made to a paper of Walther,¹⁶ who claims striking results from administering injections of histidine in various cases of vomiting and gastric disturbances in pregnancy. The gastric troubles, heartburn and vomiting, disappeared very quickly under that treatment.

Finally, with regard to the occurrence of histamine in toxæmia of pregnancy it may be recorded that eclampsia and vomiting are unknown in animals during pregnancy (Hofbauer,¹² Cruickshank,¹⁷ Attlee¹⁸) but histidinuria and, of course, histaminuria are absent in pregnant animals.

SUMMARY

1. It is suggested that histamine plays an important rôle in toxæmia of pregnancy.

2. The different manifestations of the intoxication with their different symptoms and events may finally depend on the pregnant woman herself, on her adaptability to the changed conditions, and on the state of nutrition of her body. Malnutrition may play its part since Feldberg¹⁹ observed that a starved body is much less resistant to histamine than a well-nourished organism. The normal pregnant woman will more or less easily adapt herself to changes which result from the altered metabolism, and will soon overcome the trouble which perhaps small amounts of histamine, intermediately occurring, will inflict upon her. The sensitiveness of pregnant women towards histamine may vary with the individual. Hofbauer¹² found a marked difference in the sensitivity to histamine even in pregnant guinea-pigs.

3. The term toxæmia of pregnancy should be maintained, since a real toxin (histamine) has been found to be excreted in pathological pregnancy.

4. The significance of the isolation of histamine from toxæmic pregnancy urine is discussed.

5. The biological action of histamine is compared with the symptoms of toxæmia of pregnancy, and the opinion is expressed that histamine may be assumed to be a causative factor of that complex of disease.

Grateful acknowledgement is made to Professor F. A. E. Crew and Dr. C. P. Stewart for research facilities obtained. The author is deeply indebted to Professor R. W. Johnstone for the permission to use the clinical material from his ward in the Simpson Memorial Maternity Pavilion, Royal Infirmary, Edinburgh, and for his interest in this work.

Thanks are also due to Sister Duckworth, Simpson Memorial Maternity Pavilion, for valuable assistance in obtaining the clinical material.

REFERENCES

1. Kapeller-Adler, R. *Bioch. Journ.*, in the press.
2. Werle, E. *Bioch. Zeits.*, 1936, cclxxxviii, 292; 1937, ccxc, 105; 1938, ccxcvi, 315.
3. Best, C. H. *Journ. Phys.*, 1939, lxvii, 256; 1930, lxx, 349; *Bioch. Journ.*, 1932, xxvi, 1365; 1935, xxix, 315.
4. Werle, E. *Bioch. Zeits.*, 1940, ccciv, 201.
5. Irving, F. C. *Amer. Journ. Obstet. and Gynecol.*, 1936, xxxi, 466.
6. Seitz, L. *Biol. u. Pathol. des Weibes*, 1923, vii, 647.
7. v. Jaschke, R. T. *Neue deutsche Klinik.*, 1929, iii, 11.
8. Best, C. H., and E. W. McHenry. *Phys. Rev.*, 1931, xi, 371.
9. Kehrer, E. *Münchn. Med. Wochs.*, 1912, lix, 1831; 1913, lx, 1714.
10. Stroganoff, W. "The improved prophylactic method in the treatment of eclampsia," Edinburgh, 1930.
11. Stander, H. J. "Toxaemias of pregnancy," Baltimore, 1929.
12. Hofbauer, J. *Amer. Journ. Obstet. and Gynecol.*, 1926, xii, 159.
13. Heinlein, H. *Zeits. Exper. Med.*, 1937, c, 661; 1938, cii, 517; *Virch. Arch.*, 1935, ccxcvi, 448.
14. Revoltella, G. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1930, v, 377.
15. Edlbacher, S. *Zeits. Phys. Chem.*, 1937, ccxlvii, 63.
16. Walther, P. *Bull. de la Soc. Obstét. Gynéc.*, 1938, xxvii, 190.
17. Cruickshank, E. W. H. *Med. Res. Council.*, 1937, 117.
18. Attlee, H. B. *Journ. Obstet. and Gynaecol. Brit. Emp.*, 1934, xli, 751.
19. Feldberg, W., and E. Schilf. "Histamin," Springer, Berlin, 1930.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-München, J. Bodnár-Debreczen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Fge-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, M. Ferreira da Mira-Lissabon, S. Flexner-New York, A. Fodor-Jerusalem, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedmann-Moskau, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, R. Höber-Kiel, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. McKenzie-Dundee, J. Meisenheimer-Tübingen, Kurt H. Meyer-Genf, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Orla-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzár-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg, Berlin-Dahlem

unter redaktioneller Mitarbeit von **M. Jacoby**-Berlin

Sonderabdruck aus 264. Band, 1.—3. Heft

Regine Kapeller-Adler:

Über eine neue Methode zur
quantitativen Histidinbestimmung und über deren
Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen
Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen



Berlin

Verlag von Julius Springer

1933



Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt *ℳ* 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1\frac{1}{2}$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18, oder an Herrn Prof. Dr. M. Jacoby, Berlin W 35, Derfflingerstr. 19, zu richten.

Das Honorar beträgt *ℳ* 40.— für den 16seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1\frac{1}{2}$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Der Verlag bittet, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse gebeten, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

264. Band

Inhaltsverzeichnis

1.—3. Heft

	Seite
Spoehr, H. A. und Harold H. Strain. Über die angebliche Polysaccharidbildung in alkalischen Lösungen von Hexosen	1
Schlesinger, Max. Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen	6
Ege, Richard und Palle Menck-Thygesen. Über die Aktivierung des Propepsins	13
Tamchyna, Josef V. Über Hydrotropie der anorganischen Salze . .	24
Baltzer, Friedrich. Studien zum Problem des Magenschleimes. I. Mitteilung: Zur Bestimmung des Magenschleimes	28
Lissitzin, M. A. und N. S. Alexandrowskaja. Die Eiweißspaltung bei der Denaturierung	35
Meyerhof, O. und W. Kiessling. Über das Auftreten und den Umsatz der α -Glycerinphosphorsäure bei der enzymatischen Kohlenhydrat-spaltung	40

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über eine neue Methode zur quantitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen.

Von
Regine Kapeller-Adler.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juni 1933.)

I.

Für das Histidin, diesen unersetzlichen Bestandteil des Nahrungseiweißes, hat *Pauly*¹ im Jahre 1904 eine sehr empfindliche Reaktion angegeben, die bekanntlich darauf beruht, daß Histidin mit einer alkalischen Lösung diazotierter Sulfanilsäure eine kirschrote Farbe liefert.

Diese alle Imidazolderivate charakterisierende Diazoreaktion wurde zunächst von *M. Weiss* und *Ssobolew*² zu einer kolorimetrischen, von *Lautenschläger*³ zu einer titrimetrischen Histidinbestimmungsmethode umgearbeitet und erfuhr schließlich durch *Kössler* und *Hanke*⁴ eine Ausbildung zu einer kolorimetrischen Mikromethode zur Bestimmung des Histidins und sonstiger Imidazolabkömmlinge. Gegen dieses bisher allgemein geübte Verfahren sind besonders in der letzten Zeit sehr viele Stimmen laut geworden, weil es sich gezeigt hat, daß ihm verschiedene Mängel anhaften. Vor allem ist die *Pauly*sche Diazoreaktion für Imidazolkörper keineswegs spezifisch, sondern sie wird auch durch aromatische Hydroxylsäuren, Polyphenole, Aminosäuren wie Tyrosin sowie Farbstoffe des Harns⁵ hervorgerufen. Weiter ergeben sich bei der Bestimmung nach *Kössler* und *Hanke* methodische Schwierigkeiten, dadurch bedingt, daß die

¹ Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 510, 1904.

² Diese Zeitschr. 58, 119, 1914.

³ Zeitschr. f. phys. Chem. 102, 226, 1918.

⁴ J. of biol. Chem. 39, 497, 1919.

⁵ *Hunter*, Biochem. J. 16, 640, 1922.

verschiedenen Imidazolderivate in gleichen Konzentrationen nicht identische Farbreaktionen liefern und daß die Intensität dieser Farbreaktionen in ihrem Ablauf veränderlich ist. Manchmal tritt die Farbreaktion überhaupt nicht auf, weil sie durch die Anwesenheit verschiedener Stoffe, wie Harnsäure, Harnstoff und Aminosäuren verhindert wird. So erklärt es sich, daß diese Methode trotz vielfacher Modifikationen seitens verschiedener Autoren¹ häufig unbefriedigende Resultate liefert.

Es liegt im Wesen moderner biologischer Forschungsart, sich hauptsächlich derjenigen Methoden zu bedienen, welche eine *elektive Erfassung* der zu bestimmenden Substanzen ermöglichen. Nach dem Vorerwähnten ist es klar, daß die *Paulysche* Diazoreaktion trotz großer Empfindlichkeit keineswegs die Grundlage einer *spezifischen Histidinbestimmungsmethode* bilden kann, zumal sie auch durch andere Imidazolderivate und Phenole gegeben wird. So bildete der Mangel einer nur dem Histidin eigentümlichen Bestimmungsmethode die unmittelbare Veranlassung zur Durchführung der zu besprechenden Untersuchungen.

Bei der Durchsicht der die Eigenschaften des Histidins betreffenden Literatur fiel uns eine schon im Jahre 1908 von *Knoop*² veröffentlichte Reaktion auf, die darauf beruht, daß Histidin beim Erwärmen mit Bromwasser eine rötliche bis dunkelweinrote Färbung, zuletzt einen flockigen, schwarzen Niederschlag ergibt. Diese Farbenreaktion, welche nach *Knoops* Angaben nur von *Histidin* und *Histamin*, vom letzteren mit anderem Farbtone, gezeigt wird, mit so nahestehenden Histidinderivaten hingegen wie *Imidazolpropionsäure*, *Imidazolmilchsäure* und *Imidazolessigsäure* *negativ ausfällt*, wurde vielleicht wegen ihrer geringen Empfindlichkeit nicht voll ausgenutzt. Diese Reaktion wurde von *Hunter*³ durch eine kleine Modifikation empfindlicher gestaltet und neuerlich zum spezifischen Nachweis des Histidins empfohlen.

Den Ausgangspunkt unserer Versuche bildete die ursprüngliche *Knoopsche Reaktion*, und zwar interessierte es uns vor allem, die Natur des bei der vorsichtigen Bromierung des Histidins in der Wärme entstehenden schwarzen flockigen Körpers kennenzulernen. Bei einem auf die Isolierung dieser Substanz gerichteten Versuch zeigte es sich, daß sich letztere in *konzentriertem Ammoniak mit purpurroter*³, in *Ammoncarbonat mit tiefblauvioletter Farbe* auflöse. Die in der Folge angestellten Versuche ergaben, daß die Farbe der gebildeten Lösungen proportional der Konzentrationserhöhung zunimmt, daß also das *Beersche Gesetz*, welches die Grundlage der Kolorimetrie darstellt, hier Gültigkeit besitzt. Somit war der Weg für die Ausarbeitung einer neuen kolorimetrischen Histidinbestimmungsmethode gewiesen, und in zahlreichen Versuchen gelang es, die Bedingungen dieser Reaktion festzulegen.

¹ *Cavett*, J. of biol. Chem. **95**, 335, 1932; *Jorpes*, Biochem. J. **26**, 1507, 1932; *Kaufmann* u. *Engel*, Zeitschr. f. klin. Med. **114**, 405, 1930.

² Hofmeisters Beitr. **11**, 356, 1908.

³ Biochem. J. **16**, 638, 1922.

II. Methodik.

Im folgenden bringen wir eine kurze Beschreibung unserer Histidinbestimmungsmethode.

Erforderliche Reagenzien.

a) *1%ige Auflösung von Brom in 33%iger Essigsäure* (die Reaktion verläuft am besten in schwachsaurer Lösung). 5 ccm Brom werden mit 500 ccm Eisessig versetzt und mit Wasser auf 1500 ccm verdünnt.

b) *Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch*: 2 Teile konzentrierten Ammoniaks werden mit einem Teil einer 10%igen Ammoncarbonatlösung vermischt.

c) *Eine 1^o/₁₀₀ige Histidin-Standardlösung* (1 ccm entspricht 1 mg Histidin). 100 mg Histidin werden mit 2 ccm 10%iger Schwefelsäure versetzt und mit Wasser auf 100 ccm verdünnt.

In einer Meßprouvette werden 1 bis 2 ccm der Untersuchungslösung bzw. 1 bis 2 ccm der Standardlösung tropfenweise mit dem Bromreagens bis zum Bestehenbleiben einer schwachen gelblichen Färbung versetzt. Nach etwa 10 Minuten — in dieser Zeit ist sämtliches Histidin umgesetzt — werden 2 ccm des bereitgehaltenen Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches hinzugesetzt und die Reaktionsflüssigkeit für 5 Minuten in ein Becherglas mit heißem Wasser gebracht. Es erscheint alsbald eine tief blauviolette Färbung, welche beim darauffolgenden Erkaltenlassen an Intensität zunimmt und ihr Maximum erreicht. Nach weiteren 10 Minuten kann die Flüssigkeit bereits kolorimetrisch ausgewertet werden, nachdem sie vorher mit 96%igem Alkohol bis zur Marke 10 verdünnt worden ist.

Die Farbe der erhaltenen Lösungen ist stundenlang unverändert haltbar, so daß die Kolorimetrie auch später vorgenommen werden kann. Die Reaktion ist äußerst einfach auszuführen, Vorsicht ist lediglich beim Zusetzen der Bromlösung geboten. Jeder größere Bromüberschuß ist zu vermeiden, weil sonst zu niedrige Werte erhalten werden. Im Anfang, bei mangelnder Übung, ist der Endpunkt der Bromierung am besten durch Tüpfeln auf Jodkaliumstärkepapier festzustellen.

Die *Empfindlichkeit* dieser Reaktion beträgt 1:50000.

Was den Chemismus der Reaktion betrifft, so sind die diesbezüglichen Versuche noch nicht abgeschlossen.

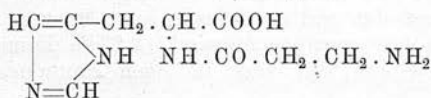
Plümmer und *Philipps*¹ haben auf quantitativem Wege ermittelt, daß 1 Molekül Histidin bei vorsichtiger Bromierung zwei Atome Brom addiert. *Lieben* und *Müller*² geben an, daß Histidin schon nach drei- bis fünfständiger Bromeinwirkung beträchtlich *mehr als zwei Bromatome* pro Molekül verbraucht. Die Autoren vermuten, daß das Brom zunächst substituierend, in weiterer Folge aber oxydierend auf das Histidin einwirkt. Diese Annahme stimmt gut mit *Knoops* Angaben und unseren eigenen Beobachtungen überein, weil ein größerer Bromüberschuß die Färbung offenbar infolge Zerstörung des Moleküls verhindert.

Welche *Konstitution* dem in unseren Versuchen entstehenden tiefblauvioletten-Farbstoff zukommt, konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Anscheinend handelt es sich hierbei um die Bildung eines

¹ Biochem. J. 18, 312, 1924; vgl. auch *Siegfried* u. *Reppin*, Zeitschr. f. phys. Chem. 95, 18, 1915.

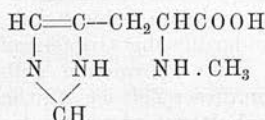
² Diese Zeitschr. 197, 127, 1928.

komplizierten Ringschlusses. Jedenfalls muß hervorgehoben werden, daß das Zustandekommen dieser Reaktion an das Vorhandensein eines *intakten Alaninrestes* gebunden ist. Denn weder die Imidazolpropionsäure noch die Imidazolmilchsäure noch Imidazolessigsäure zeigen diese Reaktion. Ist nur ein Wasserstoffatom der Amidogruppe des Alaninrestes, wie es beim *Carnosin*, dem β -Alanylderivat des Histidins



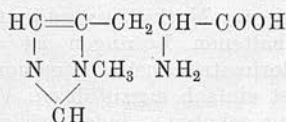
der Fall ist, besetzt, so verläuft die Reaktion negativ.

Auch das von *Fargher* und *Pyman*¹ zuerst dargestellte *Methylhistidin*



gibt keine positive Reaktion. Eine solche, allerdings recht schwache, zeigt lediglich *Histamin*, wobei aber der Farbton ein anderer, und zwar ein goldgelber ist.

Weiter gibt einen *positiven Ausschlag* das *isomere Methylhistidin*²



welche Substanz uns liebenswürdigerweise von Herrn Prof. *Ackermann* in Würzburg zur Verfügung gestellt worden war. Dieses Methylhistidin liefert unter den geschilderten Reaktionsbedingungen eine relativ schwache rotviolette Färbung (etwa ein Fünftel der Färbekraft des Histidins). Diesen Ergebnissen zufolge kann die besprochene Bestimmungsmethode als durchaus für *Histidin spezifisch* aufgefaßt werden.

Von größter Bedeutung für die Untersuchung von Muskelektivstoffen ist die Erkenntnis, daß das *Carnosin* die erwähnte Reaktion *nicht zeigt*. Auf Grund dieser Tatsache konnten wir eine geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung von Carnosin neben Histidin in Muskelextrakten ausarbeiten. Die hierbei erzielten Resultate decken sich vollkommen mit den entsprechenden Literaturangaben. Die diesbezüglichen Untersuchungen sind noch im Gange und werden den Gegenstand einer eigenen Veröffentlichung bilden.

Nachstehend bringen wir einen Auszug aus unseren Protokollen.

¹ J. chem. Soc. 119, 734, 1921.

² Zeitschr. f. physiol. Chem. 183, 11, 1929.

Tabelle I.

Zur Bestimmung gelangtes Histidin in mg	Gefundenes Histidin in mg	Mittel	Zur Bestimmung gelangtes Histidin in mg	Gefundenes Histidin in mg	Mittel
1,00	0,94	1,00	2,50	2,50	2,55
1,00	1,05		2,50	2,60	
1,30	1,24	1,29	2,50	2,64	
1,30	1,34		2,50	2,52	
1,50	1,50	1,47	2,50	2,54	
1,50	1,38		2,50	2,56	
1,50	1,50		2,50	2,53	
1,50	1,51		2,50	2,58	
1,60	1,75	2,03	2,50	2,50	
2,00	2,00		2,50	2,46	
2,00	2,00		2,50	2,67	
2,00	2,01		3,00	2,90	
2,00	1,96		3,00	3,12	
2,00	2,12		3,00	2,99	
2,00	2,02		3,00	3,04	
2,00	2,05		3,00	3,10	
2,00	1,98		3,00	3,05	
2,00	2,17		3,00	2,97	
2,00	2,11		3,00	3,00	
2,00	1,89		3,00	3,00	
2,00	2,04	4,00	4,19		

III. Untersuchung von Eiweißhydrolysaten.

War nun einmal eine für das Histidin spezifische Bestimmungsmethode gegeben, so sollte zunächst festgestellt werden, ob sie bei der Untersuchung von Eiweißhydrolysaten brauchbare Resultate liefere. Vor allem wurden die Hydrolysate histidinreicher Proteine, von denen Analysenzahlen in der Literatur vorlagen, in den Bereich der Untersuchungen einbezogen. Vorwegnehmend soll hervorgehoben werden, daß das Histidin vor der eigentlichen Bestimmung aus dem Eiweißhydrolysat isoliert werden soll, und zwar geschieht dies am besten mittels des *Hopkinschen Reagens*.

Die Methodik der Histidinbestimmung in Eiweißhydrolysaten gestaltet sich folgendermaßen:

2 bis 3 g Eiweiß werden 20 Stunden lang mit 25%iger Schwefelsäure hydrolysiert. Aus der Hydrolysenflüssigkeit wird der Überschuß der Schwefelsäure durch Bariumcarbonat entfernt, das gebildete Bariumsulfat wird abfiltriert, der Niederschlag öfters mit Wasser zwecks Vermeidung größerer Verluste ausgekocht und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In aliquoten Teilen des Filtrats wird der Stickstoffgehalt mittels *Mikro-Kjeldahl*-Bestimmung und somit der nunmehrige Eiweißgehalt ermittelt. Ein größerer aliquoter Teil (etwa zwei Drittel) wird zur Isolierung der Histidinfraktion bei lackmusneutraler Reaktion am Wasserbad auf ein sehr kleines Volumen eingengt, der Rückstand in einen *Erlenmeyer*-Kolben mit wenig Wasser hinübergespült und solange mit 96%igem Alkohol versetzt,

bis eine deutliche Trübung oder ein Niederschlag entsteht. Nun wird etwa ein Drittel des verwendeten Alkoholvolumens an Äther und hierauf *Hopkinsches Reagens*¹ (eine 10%ige Auflösung von Merkurisulfat in 5%iger Schwefelsäure) im Überschuß hinzugefügt. Der entstandene Niederschlag wird über Nacht stehengelassen, dann abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Das lufttrockene Pulver wird in heißer, verdünnter Salzsäure aufgelöst, das Ungelöste abfiltriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das gebildete Mercurisulfid wird abgesaugt und das Filtrat am Wasserbad nach Neutralisation der Salzsäure eingeeengt. Der Rückstand wird in 10 bis 20 ccm 10%ige Schwefelsäure aufgenommen und die gewonnene Lösung „L“ bildet das Ausgangsmaterial für die nachfolgende kolorimetrische Histidinbestimmung.

Sowohl in Eiweißhydrolysaten als auch in sonstigen biologischen Flüssigkeiten kommen Stoffe vor, welche die geschilderte Histidinbestimmungsmethode insofern stören, als sie den bei der Reaktion gebildeten blauvioletten Farbton durch einen braunen überdecken. Man kann aber die *unangenehme Wirkung* dieser Substanzen vollkommen durch *Oxydation der schwefelsauren Extrakte* mit *n/10 Kaliumpermanganatlösung ausschalten*. Daß Histidin in schwefelsaurer Lösung durch Kaliumpermanganat nicht angegriffen wird, ist aus der Literatur² her hinlänglich bekannt.

Die Bestimmung wird in ihrem weiteren Verlauf wie folgt durchgeführt:

1 bis 2 ccm der Lösung L werden in einer Meßeprouvette tropfenweise mit einer n/10 Kaliumpermanganatlösung solange versetzt, bis die letztere eben nicht mehr entfärbt wird. Nach einigen Minuten verschwindet die schwache Rosafärbung und es resultiert eine wasserhelle Flüssigkeit. Mitunter trübt sich die Lösung infolge Bildung von Braunstein. Bringt man nun die Eprouvette für wenige Minuten in ein heißes Wasserbad, so geht der braune Niederschlag in Lösung. Die vollkommen erkaltete wasserhelle Flüssigkeit wird nun mit dem Bromreagens tropfenweise vorsichtig bis zum Bestehenbleiben einer schwachen Gelbfärbung versetzt. Manchmal verschwindet die Gelbfärbung schon nach ganz kurzer Zeit, ein Beweis dafür, daß zu wenig Bromlösung verwendet worden war. In diesem Falle fügt man noch einige Tropfen hinzu. Die schwache Gelbfärbung soll 10 Minuten unverändert bestehen bleiben. In dieser Zeit ist sämtliches Histidin mit Bestimmtheit umgesetzt. In einer anderen Meßeprouvette werden 1 bis 2 ccm der 1⁰/₁₀₀igen Standardlösung analog aufgearbeitet. Beide Eprouvetten werden mit je 2 ccm des Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches versetzt und für 5 Minuten in ein Becherglas mit kochendem Wasser gebracht. Nach dieser Zeit werden die die blauviolett gefärbten Reaktionslösungen

¹ Von der quantitativen Fällbarkeit des Histidins durch *Hopkinsches Reagens* unter den geschilderten Bedingungen konnten wir uns wiederholt überzeugen. Außerdem existieren diesbezügliche Daten in der Literatur, so von *Kossel* u. *Patten*, *Zeitschr. f. phys. Chem.* **38**, 39, 1913, und von *Vickery*, *J. of biol. Chem.* **78**, 631, 1928.

² *Herzog*, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **37**, 248, 1902; *Pauly*, ebenda **42**, 510, 1904.

enthaltenden Eprouvetten erkalten gelassen, am besten durch Eintauchen in ein Becherglas mit kaltem Wasser, wobei das Kühlwasser häufig gewechselt wird. Es kommt dabei zur Ausbildung des Farbmaximums. Nach weiteren 10 Minuten kann bereits kolorimetriert werden, wobei die Standardlösung mit 96 %igem Alkohol bis zur Marke 10, die Untersuchungslösung hingegen mit dem *Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch* erst unmittelbar vor dem Vergleich bis zur gleichen Marke verdünnt wird. Alkohol darf hier nicht als Lösungsmittel zur Anwendung gelangen, weil die violette Farbe im Gegensatz zu reinen Histidinlösungen in Untersuchungslösungen durch Alkohol sehr bald abbläßt. Im allgemeinen lassen sich die erhaltenen Färbungen mit der optisch gleichwertigen Histidinstandardlösung gut vergleichen.

Übrigens ist die Umbildung dieser Methode für Messungen mittels des *Pulfrichschen Stufenphotometers* bereits von uns in Angriff genommen worden, und wir werden bei späterer Gelegenheit darüber berichten.

Die bei der Untersuchung von Eiweißhydrolysaten erhaltenen Werte finden sich in Tabelle II zusammengefaßt. Zur Untersuchung gelangten *Pferdehämoglobin, Casein und Fibrin*, und zwar von jedem Protein zwei verschiedene Hydrolysenflüssigkeiten.

Tabelle II.

	100 g enthalten Histidin in g, Mittelwerte	Literaturwerte in %	Autoren
Kristallisiertes Pferdehämoglobin	7,45 7,32	7,5—7,6 7,6—7,9	<i>Vickery</i> , J. of biol. Chem. 79 , 382. 1928. <i>Abderhalden</i> , Fermentforschung 10 , 446, 1929. <i>Jorpes</i> , Biochem. J. 26 , 1495, 1932.
Casein	4,14 4,09	3,4—3,8	<i>Lautenschläger</i> , Zeitschr. f. physiol. Chem. 102 , 243, 1918.
Fibrin	3,33, 3,73	1,9—3,2	<i>Levene</i> und <i>van Styke</i> , J. f. physiol. Chem. 10 , 57, 1911. <i>Lock</i> u. <i>Thomas</i> , Zeitschr. f. physiol. Chem. 87 , 74, 1913.

Die bei der Untersuchung von *Pferdehämoglobin* erhaltenen Zahlen stimmen sehr gut mit den Literaturwerten, welche durchwegs aus jüngster Zeit stammen, überein. Sowohl beim *Casein* als auch insbesondere beim *Fibrin* lagen die von uns ermittelten Werte höher, was wohl damit zusammenhängt, daß die Literaturwerte, durchgehend älteren Datums, offenbar in Verfahren, welche mit Verlusten verbunden sind, bestimmt wurden. In weiterer Folge wurden *Zusatzversuche* mit Histidin beim *Casein und Fibrin* durchgeführt.

Zusatzversuche beim Casein.

1. 1 ccm des nach der oben gegebenen Vorschrift erhaltenen Casein-auszuges, enthaltend 3,29 mg Histidin, wurde mit 1,1 mg Histidin versetzt und wie gewöhnlich aufgearbeitet. Ber.: 4,39 mg, gef.: 4,50 mg Histidin.

2. 1 ccm desselben Extraktes + 0,8 mg Histidin. Ber.: 4,09 mg, gef.: 4,20 mg Histidin.

Zusatzversuche bei Fibrin.

1. Zu 1 ccm Fibrinlösung, enthaltend 3,12 mg Histidin, wurden 1,3 mg Histidin zugesetzt. Ber.: 4,42 mg, gef.: 4,59 mg Histidin.

2. 1 ccm Extrakt + 0,5 mg Histidin. Ber.: 3,62 mg, gef.: 3,52 mg Histidin.

IV. Untersuchung von Harnen.

Arbeiten englischer Autoren¹ gaben die Veranlassung zur Übertragung der neuen Histidinbestimmungsmethode auf die Untersuchung von Harnen, insbesondere von Gravidenharnen.

Voge berichtet in seiner 1929 erschienenen Arbeit über die Anwendbarkeit der *Knoopschen* Bromwasserreaktion zur Untersuchung von Schwangerenharnen. Die in jeder Beziehung so wertvolle *Zondek-Aschheimsche* Reaktion erscheint dem Autor in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden. Er selbst gibt eine einfache Reaktion zum Schwangerschaftsnachweis an, indem er 2¹/₂ ccm Harn mit 1 ccm einer verdünnten Bromwasserlösung erhitzt. Orangerot₃ bis rote Färbung zeigt ihm eine positive Reaktion an, bei negativer Reaktion bleibt die ursprüngliche Farbe bestehen. Voge vermutet, daß diese Reaktion durch die Anwesenheit von Histidin in Gravidenharnen bedingt sei. Er versucht seine Annahme durch den Nachweis zu stützen, daß normaler Harn, der an und für sich diese Reaktion nicht zeigt, bei einem Zusatz von Histidin mit Bromwasser einen positiven Ausschlag liefert. Auf Grund der Veröffentlichung von Voge versuchten *Armstrong* und *Walker* aus *Schwangerenharnen Histidin zu isolieren*. Aus 10 Litern Harn wurde die *Kosselsche* Histidinfraktion hergestellt, und tatsächlich gelang es den Autoren aus der erwähnten Harnmenge 200 mg Histidinchlorhydrat, das sie mittels Schmelzpunktes, mittels einer Stickstoff- und Chloranalyse identifizierten, zu fassen. Diese von ihnen aus dem Harn isolierte Substanz zeigte die *Knoopsche* Bromwasserreaktion, deren Spezifität für Histidin die Autoren nachprüfen und bestätigen. Über ein Vorkommen von Histidin neben anderen Aminosäuren in Gravidenharnen konnte übrigens *Honda*² als erster berichten.

Bevor nun die Untersuchungen von Schwangerenharnen auf einen etwaigen Histidingehalt mittels unserer Histidinbestimmungsmethode in Angriff genommen wurden, sollten zunächst die von Voge gemachten Angaben überprüft werden. Zahlreiche Gravidenharne wurden nach der Vorschrift des Autors untersucht. Es stellte sich bald heraus, daß die Reaktion unzuverlässig ist, weil die auftretende Rotfärbung häufig so bald abbläßt, daß man in vielen Fällen keine Zeit hat, sich für eine

¹ Voge, Brit. med. J. 2, 829, 1929; Proc. Roy. Soc. Med. 23, 638, 1930. *Armstrong* u. *Walker*, Biochem. J. 26, 143, 1932.

² J. of Biochem. 2, 351, 1923; Ber. f. d. ges. Phys. 32, 598, 1925.

positive oder negative Reaktion zu entscheiden. In an sich stark gefärbten Harnen kann man das Ergebnis der Reaktion überhaupt nicht feststellen.

Im Verlauf unserer späteren Untersuchungen gelangten wir zur Überzeugung, daß man die Bromwasserreaktion im allgemeinen im nativen Harn gar nicht anstellen könne, weil die *Harnphosphate* diese Umsetzung merklich *stören* oder sie manchmal *ganz verhindern*.

Zur Untersuchung auf den Histidingehalt werden je nach der kleineren oder größeren Tagesmenge 150—300 ccm Mischharn oder noch besser Frühurin mit einer gesättigten Barytlösung zunächst von Phosphaten befreit, der Niederschlag abfiltriert und aus dem Filtrat das überschüssige Baryt durch Schwefelsäure entfernt. Die nach dem Abfiltrieren des Bariumsulfats gewonnene Flüssigkeit wird bei lackmusneutraler Reaktion am Wasserbad auf ein kleines Volumen eingeeengt. Der Rückstand wird analog, wie bei der Aufarbeitung von Proteinhydrolysaten beschrieben, in *alkoholisch-ätherischem Medium* mit *Hopkinschem* Reagens im Überschuß gefällt. Da wir uns wiederholt in Paralleluntersuchungen davon überzeugen konnten, daß das Histidin aus konzentrierter Lösung in Gegenwart von Alkohol und Äther sofort quantitativ fällt, kann man den *Hopkinschen* Histidinniederschlag *sofort* nach dem Absitzen aufarbeiten, was mit einer großen Zeitersparnis verbunden ist. Der Niederschlag wird, wie schon bei den Proteinen geschildert, verarbeitet. Man nimmt den nach dem Abdampfen des neutralisierten Merkurisulfidfiltrates hinterbleibenden Rückstand in 15—30 ccm 10%iger Schwefelsäure auf, so daß jeder Kubikzentimeter der gewonnenen Lösung 10 ccm ursprünglichen Harns entspricht. Die weitere Aufarbeitung ist vollkommen identisch mit derjenigen, wie sie oben geschildert worden ist. Es sei nur auf folgendes aufmerksam gemacht: Manche Harnfraktionen färben sich nach beendiger Bromierung beim Zusatz des Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches sofort gelbrot. Diese in der Kälte entstehende Färbung verschwindet oft beim Erhitzen und ist daher, da die für *Histidin charakteristische Färbung* erst beim *Erwärmen auftritt* und als solche *bestehen bleibt*, für letztere Substanz *keineswegs beweisend*.

Die aus dem Harn gewonnenen Lösungen liefern bei *Anwesenheit* von *Histidin* eine mehr oder weniger *intensiv violett gefärbte Flüssigkeit*. Da uns die Größenordnung des jeweils zur Ausscheidung im Harn gelangenden Histidins interessierte, haben wir immer bei positivem Ausfall der Reaktion die gefärbte Lösung kolorimetrisch ausgewertet. Die gesamte Harnuntersuchung auf Histidin kann in 3 bis 4 Stunden beendet sein.

Auf diese Art haben wir *normale weibliche* und *männliche Harn*, Harn von *Schwangeren* in *verschiedenen Graviditätsmonaten* (2 bis 10), von *Wöchnerinnen* und verschiedene *pathologische Harn* in den Kreis unserer Untersuchungen einbezogen.

Da dieser Teil der Arbeit den Gegenstand einer eigenen Publikation im Rahmen einer klinischen Zeitschrift bilden wird, beschränken wir uns hier auf eine kurze Diskussion der hierbei erzielten Ergebnisse: Alle zur Untersuchung gelangten *55 Gravidenharn* enthielten *kleinere oder größere Histidinnengen* (6 bis 75 mg-% und mitunter bis 800 mg in der Tagesmenge). In keinem einzigen Falle verlief die Reaktion negativ. Dieser Befund erscheint um so wichtiger, als *Histidin* mit ganz wenigen Ausnahmen *weder*

im Harn gesunder noch kranker, nicht gravidier Frauen bisher auffindbar war. In den spärlichen positiven Fällen waren die nachgewiesenen Histidinemengen äußerst gering und nicht zu vergleichen mit den hohen Histidinwerten der Mehrzahl der Gravidienharnen. Selbstverständlich müssen die gesamten Untersuchungen auf eine viel breitere Basis gestellt werden, und eine weitgehende Überprüfung der erhobenen Befunde muß vorgenommen werden, um über die praktische Brauchbarkeit dieser Reaktion zu einem Urteil zu gelangen. Das Untersuchungsergebnis der Wöchnerinnenharnen spricht für ein *langsames Absinken* der *Histidinausscheidung post partum*. Weiter gelangten auch Harnen zur Untersuchung, welche von anderer Seite auf die *Zondek-Aschheimsche Reaktion* geprüft worden waren. In neun von zehn untersuchten Fällen war eine weitgehende Übereinstimmung beider Reaktionen zu beobachten. Auf die Diskussion der Frage, wieso es gerade im Harn von Graviden zu einer Histidinausscheidung komme, soll nicht eingegangen werden. Die Verhältnisse liegen viel zu kompliziert, als daß man diese Erscheinung ohne weiteres erklären könnte. Was die Art der pathologischen Harnen betrifft, so wurden hauptsächlich solche von *Leberkranken, Lungenleidenden und Carcinompatienten* untersucht. Bei den Harnen von leberkranken Personen verlief die Histidinreaktion vollkommen *negativ*. In diesem Zusammenhang sei an eine Arbeit von *Kaufmann* und *Engel*¹ erinnert, in welcher die Autoren über eine Hyperimidazolurie bei Leberleidenden berichten. Nach unseren Erfahrungen kommt bei dieser Erscheinung freies Histidin jedenfalls nicht in Frage. Auch in den anderen untersuchten pathologischen Harnen ließ sich Histidin im allgemeinen nicht nachweisen. Interessanterweise zeigten normale männliche Harnen zum Unterschied von normalen weiblichen die Histidinreaktion öfters positiv, wenn auch die nachgewiesenen Mengen äußerst gering waren. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß Versuche, die *hormonale Beeinflussung* der *Histidinausscheidung* im Harn betreffend, von uns bereits begonnen wurden, zur Zeit jedoch noch nicht abgeschlossen sind.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine neue *spezifische* Methode zur *kolorimetrischen Histidinbestimmung*, welche auf einer *Umbildung der Knoopschen Bromwasserreaktion* beruht, angegeben. Histidin liefert, mit einer Bromessigsäurelösung vorsichtig in Reaktion gebracht und hierauf mit einem bereitgehaltenen Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch umgesetzt, beim Erwärmen eine tiefblauviolette Färbung. Diese Reaktion folgt dem *Beerschen Gesetz*, ihre Empfindlichkeit beträgt 1:50000.

2. Diese Histidinbestimmungsmethode hat gegenüber den bisher geübten Verfahren den Vorteil, für Histidin vollkommen *spezifisch* zu sein. Ihr Zustandekommen ist an das Vorhandensein einer *intakten Alaninseitenkette* gebunden. Auch die nächsten Derivate des Histidins wie Imidazolpropionsäure, Imidazolmilchsäure und Imidazolessigsäure, ja nicht einmal das Carnosin, das β -Alanylderivat des Histidins, geben diese Reaktion.

¹ Zeitschr. f. klin. Med. 114, 50, 1930.

Eine positive Reaktion, eine allerdings *sehr schwache goldgelbe Färbung*, liefert das *Histamin*, und eine ebenfalls *sehr geringe, rotviolette* das *Methylhistidin*, das Spaltprodukt des Anserins.

Auf Grund der Tatsache, daß *Carnosin diese Reaktion nicht zeigt*, wurde eine *Bestimmungsmethode von Carnosin neben Histidin* in Muskel-extrakten ausgearbeitet.

3. Dieses Verfahren wurde zu einer quantitativen Histidinbestimmung in *biologischen Flüssigkeiten* ausgebaut. Hierbei wird das Histidin zunächst isoliert, und zwar am besten mittels des *Hopkin-*schen Reagens.

4. Mittels dieses Verfahrens wurde der Histidingehalt einiger Eiweißhydrolysate ermittelt. Beim *Pferdehämoglobin* wurden *7,32 bis 7,45%*, beim *Casein* *4,09 bis 4,14%* und beim *Fibrin* *3,33 bis 3,73%* *Histidin* ermittelt. Die Pferdehämoglobinwerte stimmen sehr gut mit den entsprechenden Literaturzahlen überein, die Werte von Casein und Fibrin liegen höher als die Literaturangaben.

5. Diese Methodik wurde auch zur *Untersuchung von Harnen herangezogen*, und zwar wurden *normale weibliche und männliche, Schwangeren-, Wöchnerinnen-* und verschiedene *pathologische Harne* geprüft. Sämtliche untersuchten *Harne von Schwangeren* in verschiedenen Graviditätsmonaten enthielten *Histidin in kleinerer oder größerer Menge* (6 bis 74 mg-% und mitunter bis 800 mg in der Tagesmenge).

Laser, H. Der Stoffwechsel von Gewebekulturen und ihr Verhalten in der Anaerobiose	72
Schulz, Fr. N. und Max Becker. Die Synthese der zweisäurigen Triglyceride von Palmitinsäure und Myristinsäure. VI. Mitteilung über Insektenwache	87
Wohlgemuth, J. Die Fermente der Haut. X. Über die Katalase der menschlichen Haut. Von E. Szörényi	94
Walther, B. und H. v. Wattenwyl. Die Beeinflussung der Gewebsatmung durch Adrenalin	104
Bernhauer, K. und F. Slanina. Zum Chemismus der durch Aspergillus niger bewirkten Säurebildungsvorgänge. X. Mitteilung: Über die Bildung von Oxalsäure aus Ameisensäure	109
Berger, E. und H. Erlenmeyer. Beziehungen zwischen der Struktur der Antigene und der Spezifität der Antikörper. VI. Mitteilung: Über die Bedeutung der Molekulargröße der Haptene für deren Affinitätsgrad zu den Antikörpern	113
Behrens, Behrend und Jakob Wajzer. Der lokale Reizeffekt von Calciumsalzen in Beziehung zu ihrer Dissoziation	120
Hirohata, Ryozo, Hachiwo Shimokawa und Osamu Kamizawa. Über eine neue Eiweißprobe im menschlichen Harn	126
Kapeller-Adler, Regine. Über eine neue Methode zur quantitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen	131
Fürth, Otto und Eduard Herbert Majer. Über das Auftreten von Imidazolderivaten im Harn	142
Brücke, Franz Th. Über Glykogenbildung in Hefe	157
Browne, J. S. L. und Rhoda Grant. Über Milchsäurebildung in Leberbrei	163
Fischer, Albert. Über die chemische Natur des Thrombins. I. Mitteilung: Fraktionierung und Anreicherung	169
— Über die chemische Natur des Thrombins. II. Mitteilung: Die Komponenten des Thrombins	178
— Über die chemische Natur des Thrombins. III. Mitteilung: Die Kupplung der Thrombinkomponenten	184
Chrzaszcz, T. und J. Janicki. Sistoamylase in Malzen verschiedener Getreidearten und ihr wirklicher Amylasegehalt	192
Lundsgaard, Einar. Hemmung von Esterifizierungsvorgängen als Ursache der Phlorrhizinwirkung	209
— Die Wirkung von Phlorrhizin auf die Glucoseresorption	221
Malowan, Siegfried L. Die Bestimmung der Gesamtserumproteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen	224
Forssman, Sven. Bakterielle Bildung von 1-(+)Amylalkohol	228
— Über das Enzymsystem des <i>Termobacterium mobile</i> (<i>Pseudomonas Lindneri</i>)	231
Berichtigung	236

Beilsteins Handbuch der organischen Chemie

Vierte Auflage

Herausgegeben von der Deutschen Chemischen Gesellschaft

Hauptwerk, die Literatur bis 1. Januar 1910 umfassend

Bearbeitet von Bernh. Prager, Paul Jacobson †, Paul Schmidt, Dora Stern

- | | |
|--|---|
| <p>1. Band: Leitsätze für die systematische Anordnung. Acyclische Kohlenwasserstoffe, Oxy- und Oxo-Verbindungen. XXXV, 983 Seiten. 1918. Geb. RM 128.—</p> <p>2. Band: Acyclische Monocarbonsäuren und Polycarbonsäuren. VIII, 920 Seiten. 1920. Gebunden RM 116.—</p> <p>3. Band: Acyclische Oxy-Carbonsäuren und Oxo-Carbonsäuren. X, 938 Seiten. 1921. Gebunden RM 118.—</p> <p>4. Band: Acyclische Sulfinsäuren und Sulfonsäuren. Acyclische Amine, Hydroxylamine, Hydrazine und weitere Verbindungen mit Stickstoff-Funktionen. Acyclische C-Phosphor-, C-Arsen-, C-Antimon-, C-Wismut-, C-Silicium-Verbindungen und metallorganische Verbindungen. XVI, 734 Seiten. 1922. Gebunden RM 94.—</p> <p>5. Band: Cyclische Kohlenwasserstoffe. VI, 796 Seiten. 1922. Gebunden RM 100.—</p> <p>6. Band: Isocyclische Oxy-Verbindungen. X, 1285 Seiten. 1923. Gebunden RM 162.—</p> <p>7. Band: Isocyclische Monooxy-Verbindungen und Polyoxy-Verbindungen. VIII, 955 Seiten. 1925. Gebunden RM 128.—</p> <p>8. Band: Isocyclische Oxy-Oxo-Verbindungen. VIII, 616 Seiten. 1925. Gebunden RM 80.—</p> <p>9. Band: Isocyclische Monocarbonsäuren und Polycarbonsäuren. XI, 1063 Seiten. 1926. Gebunden RM 160.—</p> | <p>10. Band: Isocyclische Oxy-Carbonsäuren und Oxo-Carbonsäuren. XII, 1124 Seiten. 1927. Gebunden RM 164.—</p> <p>11. Band: Isocyclische Sulfinsäuren und Sulfonsäuren. IX, 443 Seiten. 1928. Gebunden RM 90.—</p> <p>12. Band: Isocyclische Reihe. Monoamine. VIII, 1436 Seiten. 1929. Gebunden RM 260.—</p> <p>13. Band: Isocyclische Reihe. Polyamine. Oxy-Amine. X, 903 Seiten. 1930. Gebunden RM 190.—</p> <p>14. Band: Isocyclische Reihe. Oxo-Amine, Amino-Carbonsäuren, Amino-Sulfinsäuren, Amino-Sulfonsäuren. XIII, 937 Seiten. 1931. Gebunden RM 198.—</p> <p>15. Band: Isocyclische Reihe. Hydroxylamine, Hydrazine. XI, 724 Seiten. 1932. Gebunden RM 150.—</p> <p>16. Band: Isocyclische Reihe. Azoverbindungen, Diazoverbindungen, Azoxyverbindungen, Nitramine, Nitrosohydroxylamine, Triazane, Triazene, Hydroxytriazene, Triazenoxyde, Tetrazane, Tetrazene, Pentazdiene, Oktatriene, C-Phosphor-, C-Arsen-, C-Antimon-, C-Wismut-, C-Silicium-Verbindungen usw.; metallorganische Verbindungen. XXII, 1040 Seiten. 1933. Gebunden RM 212.—</p> |
|--|---|

Erstes Ergänzungswerk, die Literatur von 1910—1919 umfassend.

Herausgegeben von der Deutschen Chemischen Gesellschaft.

Bearbeitet von Friedrich Richter.

- | |
|---|
| <p>1. Band: Als Ergänzung des ersten Bandes des Hauptwerkes. XIV, 492 Seiten. 1928. Gebunden RM 76.—</p> <p>2. Band: Als Ergänzung des zweiten Bandes des Hauptwerkes. X, 355 Seiten. 1929. Gebunden RM 70.—</p> <p>3. und 4. Band: Als Ergänzung des dritten und vierten Bandes des Hauptwerkes. XVIII, 662 Seiten. 1929. Gebunden RM 130.—</p> <p>5. Band: Als Ergänzung des fünften Bandes des Hauptwerkes. XIII, 417 Seiten. 1930. Gebunden RM 88.—</p> <p>6. Band: Als Ergänzung des sechsten Bandes des Hauptwerkes. XV, 642 Seiten. 1931. Gebunden RM 128.—</p> <p>7. und 8. Band: Als Ergänzung des siebenten und achten Bandes des Hauptwerkes. XVI, 820 Seiten. 1931. Gebunden RM 162.—</p> <p>9. Band: Als Ergänzung des neunten Bandes des Hauptwerkes. XV, 476 Seiten. 1932. Gebunden RM 100.—</p> <p>10. Band: Als Ergänzung des zehnten Bandes des Hauptwerkes. XVI, 571 Seiten. 1932. Gebunden RM 118.—</p> <p>11. und 12. Band: Als Ergänzung des elften und zwölften Bandes des Hauptwerkes. XVI, 608 Seiten. 1933. Gebunden RM 125.—</p> |
|---|

Verlag von Julius Springer in Berlin

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 13

6. JANUAR 1934

Nr. 1, S. 21/22

ÜBER EINE NEUE CHEMISCHE SCHWANGERSCHAFTS- REAKTION.

Von

REGINE KAPPELLER-ADLER.

In einer vor kurzem* veröffentlichten und einer demnächst in der Wien. klin. Wschr. erscheinenden Arbeit wurde über eine neue spezifische Bestimmungsmethode des Histidins in biologischen Flüssigkeiten und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von Gravidenharnen berichtet. Diese Methode beruht darauf, daß Histidin zunächst aus der biologischen Flüssigkeit isoliert, mit einer Bromessigsäurelösung vorsichtig in Reaktion gebracht und mit einem bereit gehaltenen Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch umgesetzt, beim darauffolgenden Erwärmen eine tiefblauviolette Farbe liefert.

In zahlreichen späteren Untersuchungen ergab sich, daß es nicht unbedingt notwendig ist, das Histidin aus dem Harn zu isolieren, sondern daß die geschilderte Reaktion im letzteren direkt ausgeführt werden könne. Weiter konnte festgestellt werden, daß sämtliche untersuchten Gravidenharnen Histidin enthielten, dieses hingegen in normalen Harnen Nichtgravider vollkommen, in pathologischen Harnen bis auf ganz geringe Ausnahmen (Genitalcarcinome) fehlte. Somit war der Weg zur Ausarbeitung einer schnell ausführbaren chemischen Schwangerschaftsreaktion gewiesen.

Nach vielfacher Variierung verschiedener Versuchsanordnungen erwies sich schließlich folgende *Methodik* zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Gravidenharnen als die beste.

Erforderliche Reagenzien:

a) *Bromreagens:* 1 Proz. Auflösung von Brom in 33 Proz. Essigsäure. Man mißt in einem kleinen Meßzylinder 5 ccm Brom = 15 g Brom ab, bringt sie in einen 2-Literkolben, fügt 500 ccm Eisessig hinzu und verdünnt mit Wasser auf 1500 ccm.

b) *Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch:* 2 Teile konzentrierten Ammoniaks werden mit einem Teil einer 10 Proz. Ammoncarbonatlösung vermischt.

c) *1 prozentige Histidin-Standardlösung:* 1 ccm entspricht 1 mg Histidin. 100 mg Histidin werden mit 2 ccm 10 Proz. Schwefelsäure ver-

* Biochem. Z. 264, 131 (1933).



setzt und mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Mit einigen Kubikzentimetern Chloroform versetzt ist die Lösung unbegrenzt haltbar.

Zur Untersuchung ist *24stündiger Mischharn* unbedingt erforderlich. Trüber Harn muß durch mehrmaliges Filtrieren durch ein gehärtetes Filter (Schleicher und Schüll 602) geklärt werden.

In eine graduierte Meßprouvette (25 ccm) werden 5 ccm des klaren Mischharns gebracht und *tropfenweise* unter ständigem Umschütteln mit dem Bromreagens solange versetzt, bis die Flüssigkeit citronengelb gefärbt ist. (Tüpfeln auf Jodkaliumstärkepapier, dieses soll durch den bromierten Harn eben gebläut werden.) Jeder *größere* Bromüberschuß muß sorgfältig vermieden werden, weil sonst zu niedrige, mitunter trotz Anwesenheit von Histidin negative Resultate erhalten werden. Die Reaktionsflüssigkeit wird 10 Minuten stehen gelassen, während welcher Zeit durch Tüpfeln auf Jodkaliumstärkepapier öfters geprüft wird, ob die Bromierung des Harnes schon beendet, ob also Brom im leisen Überschuß vorhanden sei. Sollte der Bromüberschuß verschwunden sein, so gibt man noch einige Tropfen Bromreagens hinzu und tüpfelt wieder auf Jodkaliumstärkepapier. Die Umsetzung ist dann als beendet anzusehen, wenn die Reaktionslösung nach 10 Minuten Stehen das Jodkaliumstärkepapier noch deutlich bläut. Für 5 ccm Harn werden etwa 2—5 Bromreagens (manchmal auch mehr) verbraucht. Nun fügt man 3 ccm des Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches hinzu, schüttelt um und bringt die Epröuvette für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad. *Histidinhaltige* Harne färben sich hierbei je nach ihrem Histidingehalt *rötlich* bis *dunkelrot*. Hierauf wird die Epröuvette in ein Becherglas mit kaltem Wasser gebracht, wobei das Kühlwasser häufig gewechselt wird. Beim Erkalten erreicht die gebildete Farbe ihr Maximum. Die Färbung ist übrigens stundenlang unverändert haltbar. Die Farbe soll womöglich bei Tageslicht betrachtet werden.

Es ist selbstverständlich, daß von jedem Harn 2—3 Parallelbestimmungen gleichzeitig angesetzt werden.

Da im allgemeinen nur Gravidenharne eine positive Histidinreaktion zeigen, genügt für die Untersuchung der qualitative Nachweis des Histidins. Immerhin interessiert es häufig, die Menge des zur Ausscheidung gelangenden Histidins festzustellen. Diese kann colorimetrisch ermittelt werden.

Für solche Vergleichszwecke werden in einer anderen Meßprouvette 1—2 mg der obigen Histidinstandardlösung mit dem Bromreagens bis zum Bestehenbleiben einer schwach gelblichen Färbung versetzt und 10 Minuten stehen gelassen. Nach dieser Zeit fügt man 2 ccm des Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches hinzu und bringt die Epröuvette für 10 Minuten in ein heißes Wasserbad und hierauf in ein Becherglas mit kaltem Wasser. Zur Colorimetrie wird die tiefblauviolette Lösung entweder mit 60proz. Alkohol oder, wenn die zu vergleichende Flüssigkeit stark gelb überfärbt ist, mit dem jeweiligen nativen Untersuchungsharn auf dasselbe Volumen wie die Untersuchungslösung gebracht. Manchmal fällt aus dem Untersuchungsharn ein Niederschlag aus. Dieser setzt sich meist sehr bald zu Boden, so daß die überstehende Flüssigkeit leicht abdekantiert werden kann.

Während sich *histidinhaltige* Harne beim geschilderten Verfahren, wie schon oben erwähnt, *rötlich* bis *dunkelrot*



färben, werden *histidinfreie* Harnen intensiv *gelb (grünstichig) bis braun* gefärbt. Was die *Untersuchungsdauer* betrifft, so kann die Reaktion in *30 Minuten beendet sein*.

Zahlreiche mittels dieser Umsetzung an normalen und pathologischen männlichen und weiblichen Harnen durchgeführte Untersuchungen scheinen darauf hinzudeuten, daß die Histidinausscheidung im Harn für die Gravidität spezifisch ist.

Die zur Untersuchung gelangten Gravidenharnen stammten von Frauen im 2.—10. Schwangerschaftsmonat. Der Histidinhalt schwankte zwischen 6 und 74 mg%. Die frühesten Befunde wurden in der 5.—6. Schwangerschaftswoche erhoben.

Im Wochenbett wird die Histidinreaktion im Laufe von 8 Tagen negativ, ebenso nach einem Abortus. Bei Extrauteringraviditäten dürfte die Histidinreaktion ebenfalls positiv sein, denn wir konnten in 2 Fällen von operierten Extrauteringraviditäten einige Tage nach der Operation Histidin in noch deutlichen Mengen feststellen. Bei Myomen, Ovarialcysten, Amenorrhöen und beim größten Teil der untersuchten Carcinomfälle war die Reaktion vollkommen negativ. Bei einer sehr geringen Anzahl von Genitalcarcinomen wurde Histidin in äußerst kleinen Mengen nachgewiesen.

Es erscheint zu verfrüht, jetzt schon ein Urteil über die Wertigkeit dieser Schwangerschaftsreaktion zu fällen, da die Anzahl der untersuchten Fälle (rund 300) relativ gering ist, zumal die Methodik immerfort geändert wurde, bis sie schließlich die oben geschilderte günstigste Form erhielt.

Erst Nachprüfungen an Tausenden von Harnen Gravidar und Nichtgravidar werden erweisen, ob diese einfache chemische Reaktion den Bedürfnissen der Klinik voll entsprechen wird.

Die ausführliche Veröffentlichung dieser Arbeit wird noch an anderer Stelle erfolgen. (*Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien [Vorstand: Prof. Dr. O. Fürth].*)

Sonderabdruck aus der Wiener klinischen Wochenschrift
1934, Nr. 6.

Der Verlag behält sich das ausschließliche Vervielfältigungs- und Verbreitungsrecht aller in der „Wiener klinischen Wochenschrift“ veröffentlichten Beiträge und deren Verwendung für fremdsprachige Ausgaben gemäß den gesetzlichen Bestimmungen vor.

Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien
(Vorstand: Prof. O. Fürth)

**Ueber die Anwendbarkeit einer neuen
Histidinbestimmungsmethode zur Untersuchung
von Gravidenharnen***

Von Dr. **Regine Kapeller-Adler**, Assistent des Instituts

In einer in der Biochemischen Zeitschrift demnächst erscheinenden Arbeit konnte über eine neue spezifische Histidinbestimmungsmethode berichtet werden. Diese Methode, welche auf einer Umbildung der von Knoop¹ für das Histidin angegebenen Bromwasserreaktion beruht, besteht darin, daß Histidin mit einer Bromessigsäurelösung vorsichtig in Reaktion gebracht und hierauf mit einem bereitgehaltenen Gemisch von konzentriertem Ammoniak und einer 10%igen Ammonkarbonatlösung umgesetzt, beim Erwärmen eine tiefblauviolette Färbung liefert. Diese Färbung ist noch bei einer Verdünnung von 1:50.000 gut zu erkennen. Auf Grund verschiedener, die Frage des Vorkommens von Histidin im Harn erörternden Arbeiten wurde diese Methode auf die Untersuchung von normalen männlichen und weiblichen, vor allem aber Graviden- und Wöchnerinnenharnen übertragen und schließlich auch zur Ueberprüfung verschiedener pathologischer Harnen herangezogen.

Das Wenige, was über ein gelegentliches Vorkommen von kleinen Histidinmengen im Harn unter normalen oder pathologischen Bedingungen bekannt ist, findet sich in den Arbeiten von Engeland,² Heffter,³ Herrmanns,⁴ Reinwein und Thielmann,⁵ Reinwein,⁶ Komori,⁷ Sendju,⁸ Hunter⁹ und Kaufmann und Engel.¹⁰

Ueber ein Vorkommen von Histidin neben anderen Aminosäuren im Gravidenharn berichtet als erster Honda.¹¹ Der Verfasser hebt als bemerkenswert hervor, daß das Histidin im Schwangerenharn in größerer Menge als das Arginin und Lysin auftritt.

* Nach einem Vortrag, gehalten in der Wiener biologischen Gesellschaft am 29. Mai 1933.



In jüngster Zeit hat *Voge*¹² eine Arbeit veröffentlicht, in welcher er eine sehr einfache Reaktion zum Schwangerschaftsnachweis beschreibt. Es handelt sich hierbei um eine Anwendung der Knoopischen Bromwasserreaktion, wobei der Autor so verfährt, daß er 25 ccm Harn mit 1 ccm einer sehr verdünnten Bromwasserlösung erhitzt. Orangerote bis rote Färbung zeigt ihm eine positive Reaktion an, bei negativer Reaktion bleibt die Reaktionslösung gelb gefärbt. *Voge* vermutet, daß diese Reaktion durch das im Schwangerenharn anwesende Histidin bedingt sei und sucht seine Annahme durch den Nachweis zu stützen, daß normaler Harn, der die Bromwasserreaktion nicht zeigt, nach Histidinbeigabe einen positiven Ausschlag liefert. Die so ungemein wertvolle und lehrreiche Zondek-Archheimsche Reaktion erscheint *Voge* in ihrer praktischen Durchführung mit großen Schwierigkeiten und einem beträchtlichen Zeitaufwand verbunden. Im übrigen stellt er eine 91%ige Uebereinstimmung seiner eigenen Reaktion mit derjenigen von Zondek-Archheim fest.

Auf Grund der Publikation von *Voge* versuchten *Armstrong* und *Walker*¹³ aus Gravidenharn, Histidin zu isolieren. Aus 10 Liter Harn haben sie die Kosselsche Histidinfraktion hergestellt und tatsächlich gelang es ihnen, aus der erwähnten Harnmenge 200 mg Histidin-Chlorhydrat darzustellen. Infolge der großen Verluste bei der Reinigung schätzen die Autoren die ursprünglich im Harn vorhanden gewesene Histidinmenge auf 0.7 bis 1 g. Das Histidinchlorhydrat identifizierten sie mittels Schmelzpunktes, einer Stickstoff- und einer Chloranalyse. Diese von ihnen aus dem Harn isolierte Substanz zeigt eine positive Knoopische Bromwasserreaktion.

Die Arbeiten von *Honda*, *Voge*, *Armstrong* und *Walker*, welche sämtlich auf ein Vorkommen von Histidin im Gravidenharn hindeuten, beeinflußten um so eher die Entstehung der zu besprechenden Untersuchungen, als es uns inzwischen gelungen war, eine nur für das Histidin spezifische Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

Bevor aber unsere eigenen Untersuchungen in Angriff genommen wurden, sollten die von *Voge* erhobenen Befunde einer Ueberprüfung unterzogen werden. Zahlreiche Gravidenharnen wurden nach der Vorschrift des Autors verarbeitet. Es zeigte sich aber sehr bald, daß die von *Voge* angegebene Reaktion unzuverlässig ist, weil die auftretende Rotfärbung so bald abblaßt, daß man mitunter gar keine Zeit hat, sich für eine Reaktion im positiven oder negativen Sinne zu entscheiden. In an sich dunkel gefärbten Harnen kann man das Ergebnis der Reaktion gar nicht feststellen.

Methodik

Nun soll eine kurze Beschreibung der von uns für die Bestimmung von Histidin im Harn ausgearbeiteten Methode folgen. Diese besteht darin, daß aus dem Harn nach Entfernung der Phosphate zunächst das Histidin angereichert wird, und zwar am besten in der *Hopkinschen* Frak-

tion, um dann nach entsprechender Behandlung dem eigentlichen kolorimetrischen Bestimmungsverfahren zugeführt zu werden. Zur Untersuchung soll grundsätzlich Mischharn gelangen. Je nach der kleineren oder größeren Tagesmenge werden 150 bis 300 ccm Harn zur Entfernung der Phosphate mit einer gesättigten Barytlösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt, der Niederschlag durch ein Faltenfilter filtriert, mit Wasser nachgewaschen und aus dem Filtrat der Ueberschuß des Baryts durch Schwefelsäure entfernt. Das gebildete Bariumsulfat wird am Wasserbad absitzen gelassen, durch ein Faltenfilter abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen, das erhaltene Filtrat lakmusneutral gemacht und in einer großen Porzellanschale am Wasserbad auf ein sehr kleines Volumen (zirka 10 ccm) eingeengt. Der Rückstand wird mit wenig Wasser in einen Erlenmeyer-Kolben quantitativ hinübergespült und mit so viel 96%igem Alkohol versetzt, daß eine deutliche Trübung oder ein Niederschlag entsteht; hierauf wird bis zu einem Drittel des Alkoholvolumens Aether hinzugefügt und dann die Reaktionslösung mit 100 bis 150 ccm Hopkinschen Reagens (10%ige Auflösung von Merkurisulfat in 5%iger Schwefelsäure) versetzt. Es entsteht hierbei ein feiner weißer Niederschlag, welcher nach dem Absitzen sofort verarbeitet oder, wenn die Analyse keine Eile hat, über Nacht stehen gelassen wird. Die in beiden Versuchsanordnungen gewonnenen Resultate decken einander vollkommen. Es konnte nämlich durch Parallelbestimmungen wiederholt festgestellt werden, daß das Histidin aus ausreichend konzentrierten Lösungen im alkoholisch-ätherischen Medium sofort quantitativ durch Hopkinsches Reagens gefällt wird. Der Histidinniederschlag wird abgenutscht, das Filtrat in einem Eprovettenversuch geprüft, ob bei weiterem Zusatz von Hopkinschem Reagens nicht eine neuerliche Fällung entstehe, sodann der Niederschlag auf der Nutsche mit Alkohol und Aether gewaschen und getrocknet. Das lufttrockene Pulver wird in heißer verdünnter Salzsäure gelöst, das Ungelöste abfiltriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach dem Abfiltrieren des Merkurisulfids wird die Lösung durch Abdampfen am Wasserbad von der Salzsäure größtenteils befreit und der hinterbleibende braune sirupöse Rückstand in wenig verdünnter Schwefelsäure aufgelöst. Das Unlösliche wird wieder abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure auf 15 bis 30 ccm aufgefüllt, so daß jeder Kubikzentimeter der resultierenden Lösung L 10 ccm ursprünglichen Harnes entspricht. Diese hellgelb bis dunkelbraun gefärbte Lösung bildet das Ausgangsmaterial für die nachfolgende kolorimetrische Histidinbestimmung; die Menge dieser Lösung, welche unbegrenzt lange haltbar ist, reicht für zahlreiche Parallelbestimmungen aus.

Im nachfolgenden soll nun die kolorimetrische Histidinbestimmungsmethode beschrieben werden.

Erforderliche Reagentien:

a) Bromreagens: 1%ige Auflösung von Brom in 33%iger Essigsäure. (Man mißt am besten in einem kleinen Meßzylinder 5 ccm Brom = 15 g Brom ab, fügt 500 ccm Eisessig hinzu und verdünnt mit Wasser auf 1500 ccm.)

b) Ammoniak-Ammonkarbonatgemisch: 2 Teile konz. Ammoniaks werden mit 1 Teil einer 10%igen Ammonkarbonatlösung vermischt.

c) 10/100 ige Histidinstandardlösung: 1 ccm dieser Lösung entspricht 1 mg Histidin.

d) n/10 Kaliumpermanganatlösung.

In einer Meßprouvette (etwa 30 ccm) werden 1 bis 2 ccm der Lösung L₁ zur Entfernung störender Stoffe tropfenweise mit der n/10 Kaliumpermanganatlösung bis zur schwachen Rosafärbung versetzt. Nach kurzer Zeit verschwindet die Rosafärbung und es resultiert eine wasserhelle Flüssigkeit. Manchmal trübt sich die Lösung infolge Braunsteinausfalls. In solchen Fällen bringt man die Eprouvette für ganz kurze Zeit in ein heißes Wasserbad, wobei der braune Niederschlag in Lösung geht. Die vollkommen erkaltete, wasserklare Lösung wird nun vorsichtig tropfenweise mit dem Bromreagens bis zum Bestehenbleiben einer schwachen Gelbfärbung versetzt. Jeder Bromüberschuß muß sorgfältig vermieden werden, weil sonst zu tiefe, bei starkem Bromüberschuß sogar, trotz Vorhandenseins von Histidin, negative Resultate erhalten werden. Im Anfang, bei mangelnder Uebung, kann man das Ende der Bromierung am besten durch Tüpfeln auf Jodkaliumstärkepapier feststellen. Man setzt tropfenweise das Bromreagens so lange hinzu, bis die Lösung das Reagenspapier eben bläut. Manchmal verschwindet die Gelbfärbung nach wenigen Sekunden, ein Beweis dafür, daß die Reaktionsflüssigkeit noch nicht zu Ende bromiert worden ist. In solchen Fällen gibt man noch einige Tropfen der Bromlösung bis zum Bestehenbleiben der gelblichen Färbung hinzu. Letztere soll zehn Minuten unverändert bestehen bleiben. In dieser Zeit ist sämtliches Histidin bereits umgesetzt. Gleichzeitig werden in einer anderen Meßprouvette 1 bis 2 ccm der Histidinstandardlösung analog vorsichtig bromiert und nach vollendeter Reaktion werden beide Meßprouvetten mit je 2 ccm des Ammoniak-Ammonkarbonatgemisches versetzt und für fünf Minuten in ein Becherglas mit heißem Wasser gebracht. Hier tritt alsbald eine tief blauviolette Färbung auf. Bei der Untersuchung von histidinfreien Harnen bleibt die Flüssigkeit hellgelb gefärbt. Mitunter tritt beim Versetzen der bromierten Lösung mit dem Ammoniak-Ammonkarbonatgemisch schon in der Kälte eine gelbrote Färbung auf, welche

oft beim darauffolgenden Erhitzen verschwindet und welche, da die für das Histidin charakteristische Färbung meist erst in der Hitze auftritt und vor allem als solche bestehen bleibt, für letztere Substanz keineswegs beweisend ist. Beide Meßprouvetten werden zum Erkalten in ein Becherglas mit kaltem Wasser gebracht, wobei das Kühlwasser häufig gewechselt wird. Beim Erkalten erreicht die blauviolette Färbung ihr Maximum. Schon nach zehn Minuten kann kolorimetriert werden, wobei die Standardlösung mit 96%igem Alkohol bis zur Marke 10, die Untersuchungslösung hingegen erst unmittelbar vor dem Vergleich mit dem Ammoniak-Ammonkarbonatgemisch ebenfalls bis zur Marke 10 verdünnt wird. Alkohol darf hier nicht zur Anwendung gelangen, weil festgestellt werden konnte, daß durch Alkohol die Färbung in der Untersuchungslösung zum Unterschied von reinen Histidinlösungen sehr bald abblaßt. Die histidinhaltigen Harnfraktionen liefern eine mehr oder weniger intensiv violett gefärbte Flüssigkeit. Da uns die Größenordnung des jeweils zur Ausscheidung im Harn gelangenden Histidins interessierte, haben wir immer bei positivem Ausfall der Reaktion die gefärbte Lösung auch kolorimetrisch ausgewertet. Um Zeit zu sparen, wurden selbstverständlich Parallelbestimmungen und Serienversuche gleichzeitig ausgeführt. Die Versuchsdauer beträgt bei sofortiger Aufarbeitung des Hopkinschen Niederschlags drei bis vier Stunden. In den nachfolgenden Tabellen fassen wir das Gesamtergebnis unserer Versuche zusammen.

1. Untersuchung bei gesunden, nicht graviden Frauen

16 Fälle Histidin = 0
1 Fall „ = 3,42 mg^o/_o

2. Untersuchung bei kranken, nicht graviden Frauen

Laufende Nr.	Name	Diagnose	Histidin in		Laufende Nr.	Name	Diagnose	Histidin in mg ^o / _o
			mg ^o / _o	mg der Tagesmenge				
1	J.	Ca duod.	0	0	6	Mo.	Ikterus gravis	0
2	S.	Ca ventr.	0	0	7	M.	Ikterus	0
3	K.	Ca bronchi	5·3	26·7	8	M.	Leberzirrh.	0
4	P.	Basedow	5·9	38·3	9	H.	Phthisis desp.	0
5	B.	Ca ventr.	0	0	10	F.	Cholelith.	0

3. Untersuchung bei gesunden Männern

6 Fälle Histidin = 0
5 „ „ = 2,51, 6,02, 9,22, 8,33, 9,58 mg^o/_o

4. Untersuchung bei kranken Männern

Laufende Nr.	Name	Diagnose	Histidin in mg %	Laufende Nr.	Name	Diagnose	Histidin in mg %
1	Sch.	Ca bronchi	0	7	B.	Phthisis conf.	0
2	B.	Ca recti	0	8	K.	Phthisis	0
3	K.	Larynx-Ca	0	9	Kl.	Phthisis	0
4	S.	Epipharynx-Ca	0	10	S.	Phthisis	0
5	S.	Phthisis	8·3	11	R.	Larynx-Ca	0
6	E.	Kavernen	0	12	P.	Ikterus gravis	0

5. Untersuchung bei graviden Frauen

Laufende Nr.	Name	Gravid.-Monat	Histidin in		Laufende Nr.	Name	Gravid.-Monat	Histidin in	
			mg %	mg der Tagesmenge				mg %	mg der Tagesmenge
1	J.	II	16·2		31	B.	VIII—IX	26·9	252·2
2	Br.	II	16·4		31a)	B.	IX	18·3	219·2
3	B.	II	15·4		32	M.	IX	66·7	666·7
4	W.	II	19·8		33	D.	IX	66·6	712·6
5	G.	II	23·3		34	M.	IX	38·4	347·3
6	H.	II	Spuren		35	E.	IX	42·3	485·9
6a)		II	19·8	247·5	36	B.	IX	25·6	237·7
7	G.	II	Spuren		37	D.	IX	24·3	291·3
7a)	G.	II	16·9	254·2	38	L.	IX	20·8	195·8
8	Sch.	II	Spuren		39	W.	IX	12·6	252·4
9	U.	II	61·9		40	H.	IX	15·6	218·2
10	A.	II	Spuren		41	W.	IX	38·7	371·6
11	Au.	II	23·0	124·4	42	H.	IX	18·3	155·1
12	St.	II	6·9	35·2	43	F.	IX	20·0	223·0
13	W.	II	Spuren		44	K.	IX	21·3	267·7
14	J.	II	6·9	137·0	45	P.	IX	17·5	166·2
15	Sch.	II—III	23·8		46	B.	IX	45·5	795·5
16	Sch.	II—III	37·6		47	K.	IX	29·2	292·0
16a)		III	34·7		48	M.	IX	49·5	693·5
17	K.	II—III	23·0		49	K.	IX	58·3	699·0
18	S.	II—III	23·8		50	P.	IX—X	15·6	218·4
19	L.	II—III	33·3		51	Sch.	IX—X	40·3	604·0
20	C.	II—III	23·7		52	R.	IX—X	13·2	
21	K.	II—III	20·1		53	T.	IX—X	13·4	
22	Z.	II—III	74·1		54	F.	IX—X	57·7	
23	A.	II—III	35·7		55	K.	IX—X	12·6	314·5
24	H.	III—IV	12·1		56	J.	IX—X	21·4	512·8
25	W.	IV	13·5		57	D.	IX—X	28·9	354·1
26	K.	IV	23·8		58	A.	IX—X	38·2	492·3
27	S.	VII	65·2	652·2	59	B.	IX—X	12·3	180·3
28	H.	VIII	25·8	387·1	60	H.	IX—X	9·2	113·8
29	J.	VIII	25·9	311·7	61	H.	IX—X	8·7	81·7
30	E.	VIII	36·6		62	P.	IX—X	7·2	95·3
30a)		VIII—IX	28·1						

6. Wöchnerinnenharn und Harn nach einem Abortus

Lauf. Nr.	Name	Tag n. d. Geburt bzw. Abortus	Histidin in mg %	Histidin in mg d. Tagesmenge	Anmerkung
1	K.	4	16.7	234.4	
2	V.	4	33.7	303.3	
3	Z.	4	Spuren		
4	G.	10	16.1	—	Abortus

7. Untersuchungen von Harnen bei Amenorrhoe und Myom

6 Fälle von Amenorrhoe Histidin = 0
 1 Fall von Myom „ = 0

8. Untersuchungen von Zondek-Aschheim-Harnen

Laufende Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Name	R.	S.	V.	X.	A.	D.	B.	F.	E.	L.	C.
Histidin in mg %	12.2	42.9	0	15.6	0	45.8	0	Spuren	0	0	0
Zondek-Aschheim-Reaktion	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

Zusatzversuch mit Histidin bei einem normalen histidinfreien Harn

1. 100 ccm Harn + 30 mg Histidin. Der Harn wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die 5 ccm entsprechende Menge der zuletzt erhaltenen Lösung wurde für die Kolorimetrie verarbeitet.

Histidin gefunden 1.41 mg
 Histidin berechnet 1.50 mg

2. Dieselbe Lösung aufgearbeitet.

Histidin gefunden 1.45 mg
 Histidin berechnet 1.50 mg

Ergebnisse

Betrachtet man die in den einzelnen Tabellen zusammengefaßten Ergebnisse, so muß man vor allem feststellen, daß im Gegensatz zu den meisten untersuchten Harnen die Gravidenharnen durchwegs eine positive Reaktion aufwiesen. In keinem einzigen Fall verlief die Reaktion negativ. Weiters ist hervorzuheben, daß die in den Schwangerenharnen zur Ausscheidung gelangende Histidinemenge ganz regellos schwankt und daß keine Beziehung zwischen der Größe der Histidinausscheidung und dem Graviditätsmonat zu bestehen scheint.

Bei den rund 62 untersuchten Schwangerenharnen wurden Histidinwerte zwischen 6 und 74 mg% ermittelt. Da leider nicht überall Tagesmengen zur Verfügung standen, konnte der Histidingehalt der 24-Stunden-Harnmenge nicht allenthalben bestimmt werden. In den in dieser Hinsicht

untersuchten Fällen schwankt diese auch ganz außerordentlich (zwischen 35 und 796 mg pro die).

In welchem Zeitpunkt der Gravidität die Histidinausscheidung einsetzt, konnte bisher mit Sicherheit noch nicht festgestellt werden. Positive Befunde wurden schon in der sechsten Woche der Schwangerschaft erhalten. Gelegentlich konnte beobachtet werden, daß in der fünften bis sechsten Woche das Histidin im Harn der betreffenden Patientin nur spurenhaf nachweisbar war, eine Woche später hingegen schon eine deutlich bestimmbare Histidinnmenge zur Ausscheidung gelangte (vgl. Nr. 6, 6a und 7, 7a der Tab. 5). Versuche bezüglich der Feststellung des Zeitpunktes des Einsetzens der Histidinausscheidung im Gravidenharn sind noch im Gange.

Vergleicht man mit diesen Ergebnissen diejenigen der Harnuntersuchungen von gesunden nichtgraviden Frauen, so ergibt es sich, daß von 17 Fällen nur in einem einzigen ein schwach positives Resultat erhalten worden ist. Von den zehn untersuchten Harnen kranker, nichtgravider Frauen (Karzinompatientinnen, Leberkranke, Lungenleidende, ein Basedowfall) wurden nur in einem Fall von Ca. bronchi und bei einer Basedowkranken je 5 mg% Histidin ermittelt.

Auch sechs untersuchte Harne amenorrhöischer Frauen ergaben durchwegs eine negative Reaktion.

Der Harn einer Frau mit einem Myom enthielt ebenfalls keine Spur von Histidin.

Es ist selbstverständlich, daß die gesamten Untersuchungen in großem Stil nachgeprüft werden müssen, um über die praktische Brauchbarkeit dieser Reaktion ins klare zu kommen.

Die Untersuchung von Wöchnerinnenharnen scheint für ein langsames Absinken der Histidinausscheidung post partum zu sprechen. Während in zwei Fällen die im Harn ausgeschiedene Histidinnmenge noch ziemlich beträchtlich war, wurden in einem Wöchnerinnenharn nur mehr Spuren nachgewiesen. Auch der Harn einer Patientin, zehn Tage nach einem Abortus, wies deutliche Histidinnmengen auf.

In zehn von elf zur Untersuchung gelangten Harnen, welche von anderer Seite auf die Zondek-Aschheimsche Reaktion geprüft wurden, ließ sich eine weitgehende Übereinstimmung beider Reaktionen feststellen. In einem Fall wurden bei negativer Zondek-Aschheim-Reaktion 45 mg% Histidin ermittelt.

Auffallenderweise wurde die Histidinreaktion im Harn gesunder Männer viel öfter positiv erhalten als im Harn gesunder Frauen, wenn auch die erhaltenen Zahlen niedrig waren. Was es für eine Bewandnis mit dieser Tatsache hat, konnte bis jetzt noch nicht klargestellt werden.

Eine diesbezügliche Untersuchung wäre sicherlich von Interesse.

Schließlich wurden auch Harnen von karzinomkranken Männern, von Männern mit Lungenleiden und Leberaffektionen zum Gegenstand der Untersuchungen gemacht. Nur in einem Fall von schwerer Phthisis ließen sich 8 mg% Histidin bestimmen.

Entgegen den in der Literatur so häufig zitierten Histidinvorkommen in pathologischen Harnen, welche Befunde hauptsächlich auf Grund der Paulyschen Diazoreaktion erhoben worden waren, wurde mittels unserer spezifischen Methode freies Histidin mit ganz wenigen Ausnahmen in pathologischen Harnen nicht nachgewiesen.**

Schließlich sei noch hervorgehoben, daß wir Versuche bezüglich einer hormonalen Beeinflussbarkeit der Histidinausscheidung im Harn bereits begonnen, aber noch nicht abgeschlossen haben.

Für die freundliche Ueberlassung zahlreicher Graviden- bzw. Zondek-Aschheim-Harnen sind wir Herrn Dr. Alders von der II. Frauenklinik (Vorstand Prof. Weibl) und dem Wiener Laboratorium Urban und Hellmann zu großem Dank verpflichtet.

Nachtrag bei der Korrektur: In der allerletzten Zeit wurde folgende zur Orientierung dienende Schnellreaktion zum Nachweis des Histidins im Harn ausgearbeitet. 10 ccm eines 24-Stunden-Harnes werden in einer Meßprouvette mit dem oben erwähnten Bromreagens tropfenweise bis zum Bestehenbleiben eines leichten Bromüberschusses (Tüpfeln auf Jodkaliumstärkepapier) versetzt. Nach zehn Minuten werden 2 ccm des Ammoniak-Ammonkarbonatgemisches hinzugefügt und die Reaktionsflüssigkeit für fünf Minuten in ein heißes Wasserbad gebracht. Histidinhaltige Harnen färben sich hierbei rot bis dunkelviolett, welche Farbe beim darauffolgenden Erkalten ihr Maximum erreicht. Histidinfreie Harnen bleiben hierbei gelb gefärbt. Weitere diesbezügliche Versuche sind noch im Gange.

Literatur: ¹ Knoop: Hofmeisters Beitr., 1908, Bd. 11, S. 356. — ² Engeland: Zeitschr. physiol. Chem., 1908, Bd. 57, S. 49. — ³ Heffer: Zeitschr. physiol. Chem., 1925, Bd. 145, S. 290. — ⁴ Hermanns: Zeitschr. physiol. Chem., 1922, Bd. 122, S. 101. — ⁵ Reinwein u. Thielmann: Arch.

** Genaue Angaben über das Auftreten von Imidazolderivaten im Harn überhaupt (nicht von freiem Histidin) finden sich in einer demnächst in der Biochemischen Zeitschrift erscheinenden Arbeit von Otto Fürth und Eduard Herbert Majer: „Ueber das Auftreten von Imidazolderivaten im Harn.“

f. exp. Path., 1924, Bd. 103, S. 115. — ⁶ Reinwein: D. Arch. klin. Med., 1924, Bd. 44, S. 37. — ⁷ Komori: J. Bioch., 1926, Bd. 6, S. 297. — ⁸ Sendju: J. Biol., 1927, Bd. 7, S. 311. — ⁹ Hunter: Brit. med. J., 1922, Bd. 11, S. 751. — ¹⁰ Kaufmann u. Engel: Zeitschr. klin. Med., 1930, Bd. 114, S. 405. — ¹¹ Honda: J. of Bioch., 1923, Bd. 2, S. 351; Ber. ges. Physiol., 1925, Bd. 32, S. 598. — ¹² Voge: Brit. med. J., 1929, Bd. II, S. 829; Proc. Roy. Soc. Med., 1930, Bd. 23, S. 638. — ¹³ Armstrong u. Walker: Biochem. J., 1932, Bd. 26, S. 143.

Sonderabdruck
aus „Biochemische Zeitschrift“ 271, 206, 1934.
Verlag von Julius Springer, Berlin W 9.



Über eine stufenphotometrische Bestimmung des Histidins.

Von

Regine Kapeller-Adler.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 24. April 1934.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Vor kurzem¹ habe ich eine kolorimetrische Histidinbestimmungsmethode angegeben, welche darauf beruht, daß *Histidin* zunächst mit einer Lösung von Brom in Essigsäure vorsichtig in Reaktion gebracht und hierauf mit einem Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch umgesetzt, beim Erwärmen eine tiefblauviolette Färbung liefert. Da für diese Farb-reaktion das Beersche Gesetz Gültigkeit besitzt, war es nicht schwer, diese Umsetzung zu einer stufenphotometrischen Histidinbestimmungsmethode auszugestalten.

In der oben erwähnten Arbeit findet sich eine genaue Beschreibung der Untersuchungsmethode von biologischen Flüssigkeiten auf Histidin.

Zur stufenphotometrischen *Histidinbestimmung* werden aliquote Teile der nach der gegebenen Vorschrift hergestellten Lösung in einer Meßeprouvette tropfenweise mit n/10 Kaliumpermanganatlösung bis zum Bestehenbleiben einer schwachen Rosafärbung versetzt. Nach kurzer Zeit verschwindet die Rosafärbung und es resultiert eine wasserhelle Flüssigkeit. Sollte jedoch die Untersuchungslösung noch einen gelben Farbton aufweisen, so wird weiter n/10 Kaliumpermanganatlösung tropfenweise hinzugefügt. Die Flüssigkeit soll unter allen Umständen vor der eigentlichen Histidinbestimmung vollkommen klar und farblos sein. Mitunter kommt es bei der Oxydation der Lösung mit Kaliumpermanganat zu einer Braunsteinbildung. Bringt man in diesem Falle die Eprouvette für einige Minuten in ein Becherglas mit heißem Wasser, so geht der braune Niederschlag in Lösung. Die vollkommen erkaltete, wasserklare Flüssigkeit wird nun tropfenweise mit dem Bromreagens bis zum Bestehenbleiben einer schwachen Gelbfärbung versetzt. Sollte diese schon nach ganz kurzer Zeit verschwinden, so fügt man noch einige Tropfen des Reagens hinzu. Die Reaktion ist dann als beendet aufzufassen, wenn die schwache Gelbfärbung durch 10 Minuten unverändert bestehen bleibt. Nach dieser Zeit gibt man 2 ccm des bereithaltenen Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches hinzu und bringt die Eprouvette für 5 Minuten in ein Becherglas mit kochendem Wasser. Die Lösung färbt sich hierbei intensiv violett, welche Färbung ihr Maximum in der Kälte erreicht. Der Eprouvetteninhalt wird vollkommen erkalten gelassen und kann gleich der stufenphotometrischen Untersuchung zugeführt werden. Bei Bestimmungen in reinen Histidinlösungen wird mit 96 %igem Alkohol, bei Untersuchungen von biologischem Material mit dem

¹ Diese Zeitschr. 264, 131, 1933; vgl. J. Knoop, Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. 11, 356, 1908; Hunter, Biochem. J. 16, 638, 1922.

Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch bis zur Marke 15 aufgefüllt und gut durchgemischt. Die stufenphotometrische Messung wird unter Vorschaltung des Filters S 50 in einer Küvette von 5 bzw. 2,5 mm Schichtdicke vorgenommen und ist bei der Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten innerhalb einer halben Stunde nach dem Verdünnen mit dem Ammoniak-Ammoncarbonatgemenge durchzuführen. In reinen Histidinlösungen kann die stufenphotometrische Messung auch nach Stunden vorgenommen werden. Als Kompensationsflüssigkeit benutzt man bei der Untersuchung biologischen Materials das Ammoniak-Ammoncarbonatgemisch, bei reinen Histidinlösungen 96 %igen Alkohol.

Die Abb. 1 und 2 versinnbildlichen die Eichkurven für die Konzentrationsbestimmung von Histidinlösungen.

Bei der in der Abb. 1 dargestellten Eichkurve sind an der Ordinate direkt die Durchlässigkeitswerte D in Prozenten (Ablösungen), die man bei der Ausführung der Messung mit dem Filter S 50 und Kuvetten von 5 mm Schichtdicke erhält, eingetragen. An der Abszisse sind die in einem Volumen von 15 ccm der vorschriftsgemäß hergestellten Farblösung enthaltenen Konzentrationen eingezeichnet. Das Diagramm erlaubt, innerhalb des angegebenen Intervalls von 0,25 bis 3,5 mg Histidin pro 15 ccm Lösung zu jeder Ablesung direkt die Konzentration zu entnehmen. In der Abb. 2 sind nicht direkt die abgelesenen Werte für die Durchlässigkeit D in Prozenten, sondern die Werte von $\log 1/D$, welche der jedem Stufenphotometer beigelieferten Tabelle entnommen werden, für die Schichtdicke 5 mm in Abhängigkeit von der Konzentration eingetragen. Bei Benutzung dieser Eichkurve muß also zunächst zu jeder Ablesung der Wert von $\log 1/D$ in der oben erwähnten Tabelle aufgesucht werden. Zu den so ermittelten Werten kann man dann die Konzentration aus der Kurve entnehmen.

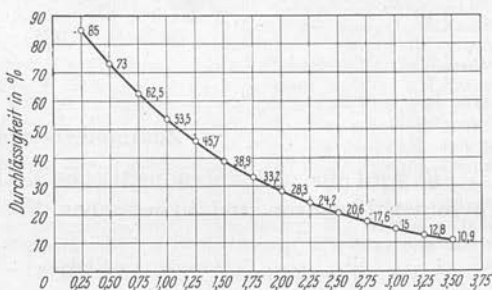


Abb. 1.

Histidin in mg pro 15 ccm der vorschriftsgemäß hergestellten Farblösung bei einer Schichtdicke von 5 mm unter Vorschaltung des Filters S 50.

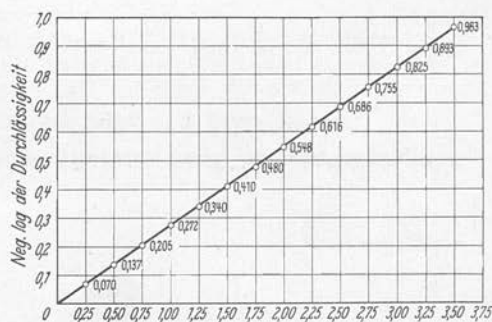


Abb. 2.

Histidin in mg pro 15 ccm der vorschriftsgemäß hergestellten Farblösung bei einer Schichtdicke von 5 mm unter Vorschaltung des Filters S 50.

Mittels dieser Methode wurden zunächst Bestimmungen an ge-
stellten Histidinlösungen durchgeführt. Die Resultate waren sehr

befriedigend. Nach diesen Untersuchungen wurden stufenphotometrische Bestimmungen an entsprechend aufgearbeiteten *Caseinhydrolysaten*¹ vorgenommen. Das Ergebnis findet sich in der nachfolgenden Tabelle. Vergleichsweise habe ich auch die von mir früher mittels dieser Methode kolorimetrisch bestimmten Werte und Literaturzahlen angeführt.

Tabelle.
Histidingehalt des Caseins in Prozenten.

Stufenphoto- metrisch	Kolori- metrisch	Literaturwerte
3,48	4,09	3,4—3,8 (<i>Lautenschläger</i> , <i>Zeitschr. f. physiol. Chem.</i> 102 , 243, 1928)
3,66	4,14	
3,70		

Die für das Casein stufenphotometrisch ermittelten Werte sind etwas niedriger als die mit derselben Methode kolorimetrisch bestimmten und stimmen gut mit den Literaturzahlen überein.

Zusammenfassung.

Es wird eine stufenphotometrische Methode zur Histidinbestimmung in reinen Lösungen und biologischen Flüssigkeiten angegeben.

¹ Vgl. diese Zeitschr. **264**, 133, 1933.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, E. Aubel-Paris, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-New York, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Belgrad, Fr. Boas-München, J. Bodnár-Debreczen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-München, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, M. Ferreira de Mira-Lissabon, S. Flexner-New York, A. Fodor-Jerusalem, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-London, E. Friedmann-Moskau, Cl. Fromageot-Lyon, O. Fürth-Wien, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Lüttich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Istanbul, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, R. Höber-London, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewemann-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, A. McKenzie-Dundee, J. Meisenheimer-Tübingen, Kurt H. Meyer-Genf, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Orla-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzár-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg und **W. Grassmann**

Berlin-Dahlem

Dresden

Sonderabdruck aus 272. Band, 5.—6. Heft

Regine Kapeller-Adler und Heinz Kohut:

Über Imidazolkörperausscheidung im Säugetierharn



Berlin

Verlag von Julius Springer

1934



Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt RM 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an die Herausgeber:

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hiltorfstraße 18, oder
Herrn Prof. Dr. W. Grassmann, Dresden 24, Wielandstraße 2,

zu richten.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Autoren erhalten eine *Fahnenkorrektur*. Revisionen können nur ausnahmsweise verabfolgt werden und verursachen oft eine Zurückstellung der Mitteilung. Auf Wunsch der in weit entfernten oder überseeischen Ländern wohnenden Mitarbeiter wird die Korrektur ihrer Abhandlung hier gelesen, wodurch ein beschleunigtes Erscheinen ermöglicht wird.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchste-falle RM 30.— für eine Arbeit.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 40 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum gleichen Preise berechnet werden, den die Arbeit im Heft kostet, da die umfangreiche Versendung von Sonderdrucken den Absatz der Zeitschrift schädigt. Dissertations-exemplare werden von der Verlagsbuchhandlung grundsätzlich nicht geliefert.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

272. Band

Inhaltsverzeichnis

5.—6. Heft

	Seite
Oparin, A., S. Manskaja und I. Glasunow. Die Inaktivierung der Amylase durch Adsorption an Eiweißniederschlägen	317
Bromley, N. W. und W. N. Orechowitsch. Über die Proteolyse in den regenerierenden Geweben. II. Mitteilung: Die Aktivität der Gewebeprotease in verschiedenen Gebieten des Regenerats	324
Frisch, Charlotte und R. Willheim. Über Beeinflussung der Muskelglykolyse durch Carotin	332
Frisch, Charlotte und R. Willheim. Tumorglykolyse und Carotin	337
Kapeller-Adler, Regine und Heinz Kohut. Über Imidazolkörperausscheidung im Säuge-tierharn	341
Kritschewskaja, E. I. Zur Frage der spezifischen Elution von Fermenten	348
Pincussen, Ludwig. Über Veränderung des Stoffwechsels unter Bestrahlung. XIII. Mitteilung: Die Einwirkung der Bestrahlung mit monochromatischem Licht auf Blutzucker und Milchsäure beim Kaninchen	354
Pincussen, Ludwig. Über Redoxpotentiale. III. — T. Suzuki und Ernst Otto Seitz. Redoxpotentiale und Bequereffekt bei photochemischen Vorgängen, besonders bei Bestrahlung von Selpurpur-Extrakten	357
Butkewitsch, Wl. S., E. W. Menzschinskaja und E. I. Trofimowa. Zur biochemischen Herkunft von Citronen- und Oxalsäure. II. Mitteilung: Die Mycelsubstanzen als eine Quelle der Säurebildung	364
Butkewitsch, Wl. S. Zur biochemischen Herkunft von Citronen- und Oxalsäure. III. Mit-teilung: Über biochemische Bildung von Oxalsäure und über Beteiligung von Mycel-substanzen an diesem Vorgang	371
Clarke, H. T., G. L. Foster und H. B. Vickery. Über die „neue Methode zur Darstellung von Aminon aus Aminosäuren“ von Wada	376
Neuenschwander-Lemmer, Nelly und Franz v. Leövey. Die Aktivitäts- p_s -Kurve der Alanin-Desamidase	380

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über Imidazolkörperausscheidung im Säugetierharn.

Von

Regine Kapeller-Adler und Heinz Kohut.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 9. Juli 1934.)

Die im folgenden zu beschreibenden Untersuchungen sind im Hinblick auf eine Beobachtung der einen von uns¹, daß Harn gravider Frauen durchgehend Histidin enthalten, unternommen worden. Wir hofften durch ein eingehendes Studium der experimentellen Imidazolorie unter verschiedenen Bedingungen die Frage nach dem Ursprung des im Gravidenharn immer auftretenden Histidins der Lösung näher bringen zu können. Als Versuchstiere wählten wir Meerschweinchen, welche reichlich Grünfutter bekamen und in Stoffwechselkäfigen untergebracht waren.

Zunächst wurde einem Meerschweinchen, dessen Normalharn vorher gründlich untersucht worden war, l-Histidinmonochlorhydrat, in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und mit Natriumcarbonat neutralisiert, in steigenden Mengen subcutan injiziert. In dem unter Zusatz von Chloroform und Toluol aufgefangenen Harn wurde der Gesamtstickstoff, der Imidazol- und Histidinstickstoff ermittelt. Den Gesamtstickstoff bestimmten wir mittels der Mikro-Kjeldahl-Methode. Zur Ermittlung des Imidazol- und Histidinstickstoffs wurde prinzipiell aus dem jeweiligen Harn die Hopkinsche Fraktion² isoliert. In aliquoten Teilen der letzteren wurde der Imidazolstickstoff nach Weiss und Ssobolew³ in der von O. Fürth und E. H. Majer⁴ verbesserten Form, der Histidinstickstoff nach Kapeller-Adler² bestimmt.

Weiterhin zogen wir ein trächtiges Meerschweinchen in den Kreis unserer Beobachtungen, vom Gedanken geleitet, daß das trächtige Tier zugeführtes Histidin vielleicht anders verarbeitet als das nicht trächtige.

Da ferner an einen Zusammenhang zwischen Leberfunktion und Imidazolorie⁵ gedacht werden mußte, unternahmen wir schließlich auch Versuche an phosphorvergifteten Meerschweinchen. Wir brachten Meerschweinchen Phosphor in Form von Oleum phosphoratum 1 : 1000

¹ Kapeller-Adler, diese Zeitschr. 264, 131, 1933; vgl. auch Honda, J. of Biochem. 2, 351, 1923; Voge, Brit. med. J. 2, 829, 1929; Proc. Roy. Soc. Med. 23, 638, 1930; Armstrong u. Walker, Biochem. J. 26, 143, 1932. — ² Kapeller-Adler, l. c. S. 139. — ³ Diese Zeitschr. 58, 119, 1914. — ⁴ Ebenda 264, 142, 1933. — ⁵ Vgl. Kauffmann u. Engel, Zeitschr. f. klin. Med. 114, 405, 1930.

subcutan in steigenden Mengen bei. Da bei den ersten diesbezüglichen Untersuchungen die Tiere sehr bald zugrunde gingen, führten wir schließlich einen protrahierten Versuch aus, indem wir zunächst von sehr geringen Phosphormengen ausgingen und diese dann allmählich steigerten. Für diese letzte Versuchsanordnung benutzten wir zwei Meerschweinchen, ein Kontrolltier, welches nur Phosphorgaben bekam, und ein zweites, welchem daneben noch Histidinchlorhydrat injiziert wurde.

Tabelle I zeigt die Ergebnisse des Versuchs am *normalen Meerschweinchen*. Dem Tier wurden zunächst an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 100 mg l-Histidinchlorhydrat subcutan injiziert, nach einer eintägigen Pause wurde diese Dosis auf das Doppelte gesteigert und gegen Ende des Versuchs bekam das Meerschweinchen einmal 400 mg Histidinchlorhydrat. Der *Gesamtstickstoff* des Harns erscheint gegenüber der Norm erhöht, es läßt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Größe der Histidingaben und der Gesamtstickstoffausscheidung feststellen.

Tabelle I¹.

Normales Meerschweinchen, Gewicht 350 g.
Tagesmenge enthält:

Datum	Harnvolumen in 24 Std.	Gesamt-N	Imidazol-N	Histidin-N	Injektionen: l-Histidinchlor- hydrat
1934	ccm	g	mg	mg	mg
21. II.	}	0,25	0,3	0	—
22. II.					—
23. II.	}	0,47	0,4	0	100
24. II.					100
25. II.					—
26. II.	}	0,53	0,8	0	200
27. II.					200
28. II.	}	0,45	0,8	0	200
1. III.					—
2. III.	}	0,48	0,5	0	—
3. III.					—
4. III.					—
5. III.					200
6. III.	}	0,38	1,6	0	400
7. III.					200
8. III.	}	0,33	0,8	0	—

Eine Steigerung des Harngesamtstickstoffs von Hunden bei Histidinverfütterung haben *Abderhalden* und *Einbeck*², eine solche nach einer intravenösen Histidininjektion bei einem Hunde *Stuedel* und *Freise*³ beobachten können.

¹ Die Werte stellen den für *einen* Tag berechneten Durchschnitt der einzelnen Perioden dar, welche durch Klammern gekennzeichnet sind. — ² Zeitschr. f. phys. Chem. 62, 322, 1909. — ³ Zeitschr. f. physiol. Chem. 120, 244, 1922.

Der *Imidazolstickstoff* des Harns erfährt während des Versuchs eine *minimale* Erhöhung im Verhältnis zur Größe der einverleibten Histidinmenge. Hingegen konnte während der ganzen Versuchszeit auch *nicht die geringste Spur unveränderten Histidins* im Harn nachgewiesen werden. Das dem Versuchstier zugeführte Histidin wird also im Stoffwechsel als solches vollkommen abgebaut, eine ganz geringe Menge erscheint im Harn in Gestalt eines Imidazolderivats.

Aberhalden und *Einbeck*¹ haben nach Verfütterung von 20 g Histidinmonochlorhydrat nur mehr 0,4 g derselben Substanz aus dem Hundeharn wiedergewinnen können. Nach intravenöser Zufuhr von Histidinchlorhydrat war die im Harn ausgeschiedene Histidinmenge so gering, daß sie nicht mehr zur Wägung gebracht werden konnte. Was die Natur des nach Histidininjektionen im Harn in geringen Mengen erscheinenden Imidazolkörpers betrifft, so haben *Kotake* und *Konishi*² im Hundeversuch sowohl nach Verfütterung als auch nach subcutaner Injektion von großen Mengen Histidinchlorhydrats aus dem Harn *Imidazolylacrylsäure* (Urocaninsäure) in relativ sehr kleiner Ausbeute isolieren können. *Edlbacher*³ gelang es nachzuweisen, daß der Histidinkomplex vornehmlich in der Leber leicht zerstört werde und daß hierbei das von ihm aufgefundene Ferment, die Histidase, die Hauptrolle spiele, nach *Edlbacher* soll das Histidinmolekül unter Öffnung des Imidazolringes in Ammoniak, Glutaminsäure und Ameisensäure zerfallen.

Tabelle II zeigt die von uns im Versuch mit dem *trächtigen* Meerschweinchen erzielten Resultate. Wir injizierten diesem Versuchstier recht beträchtliche Mengen von l-Histidinmonochlorhydrat. Es ergab sich im Verhalten dieses Meerschweinchens *keinerlei Unterschied gegenüber dem nichtträchtigen*. Das trächtige Meerschweinchen ist also, ebenso wie das nicht gravide, imstande, Histidin fast vollkommen abzubauen.

In der Tabelle III finden sich die Ergebnisse unseres ersten Versuchs am *phosphorvergifteten Tier*. Dem Meerschweinchen injizierten wir an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 mg Phosphor, hierauf nach einer eintägigen Unterbrechung 2 mg und am folgenden Tage 3 mg Phosphor subcutan. In der auf diese letzte Injektion folgenden Nacht starb das Tier. Gleichzeitig mit der Phosphorinjektion wurde dem Versuchstier l-Histidinchlorhydrat (je 300 mg) subcutan appliziert. Der *Gesamtstickstoff* des Harns nimmt in diesem Versuch mit der steigenden Phosphorgabe ab.

*Atusi Huruya*⁴ hat gelegentlich der von ihm bei Kaninchen studierten Phosphorvergiftung gefunden, daß die Stickstoffausscheidung im Harn mit der durch die Phosphorvergiftung bedingten, zunehmenden Störung der Nierentätigkeit sinke.

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 395, 1910. — ² Ebenda 122, 230, 1922. — ³ Ebenda 157, 106, 1926; *Edlbacher* u. *Kraus*, ebenda 191, 225, 1930; 195, 267, 1931; *Edlbacher* u. *Neber*, ebenda 224, 261, 1934; vgl. auch *Mislowitzer* u. *Kaufmann*, diese Zeitschr. 226, 325, 1930; 234, 101, 1931.

— ⁴ J. of Biochem. 10, 63, 1928.

Tabelle II¹.

Trächtiges Meerschweinchen, Gewicht 480 g.
Tagesmenge enthält:

Datum	Harn- volumen in 24 Std. ccm	Gesamt-N g	Imidazol-N mg	Histidin-N mg	Injektionen: 1-Histidin- chlorhydrat mg	Bemerkungen
1934						
12. IV.	110	0,38	2,5	0	—	
13. IV.	75	0,48	1,0	0	—	
14. IV.					—	
15. IV.					—	
16. IV.	60	0,53	2,0	0	300	
17. IV.					300	
18. IV.	60	0,40	2,7	0	600	
19. IV.					—	
20. IV.	98			0	—	In der Nacht auf den 20. IV. 1934: Partus
21. IV.					—	
22. IV.					—	

Tabelle III¹.

Phosphorvergiftetes Meerschweinchen, Gewicht 380 g.
Tagesmenge enthält:

Datum	Harn- volumen in 24 Std. ccm	Gesamt-N g	Imid- azol-N mg	Histidin- N mg	Injektionen:		Bemerkungen
					1-Histidin- chlorhydrat mg	Phos- phor mg	
1934							
5. IV.	130	0,50	1,3	0	—	—	
6. IV.	87	0,38	1,3	0	300	1,0	
7. IV.					—	1,0	
8. IV.					—	—	
9. IV.	43	0,28	4,3	2,7	300	2,0	
10. IV.					300	3,0	In der Nacht auf den 11. IV. 1934: Exitus

Der *Imidazolstickstoff* erfährt erst knapp vor dem Tode des Tieres eine wesentliche Steigerung. In demselben letzten Harne vor dem Exitus konnten wir auch eine Ausscheidung von *Histidin* feststellen.

Die Tabelle IV enthält die Versuchsergebnisse bei einem anderen *phosphorvergifteten Tier*, welchem nur zweimal mit eintägiger Unterbrechung je 1 mg Phosphor beigebracht worden war. Gleichzeitig mit der zweiten Phosphorgabe injizierten wir dem Tier 200 mg Histidinchlorhydrat und ebendieselbe Menge an den zwei darauffolgenden Tagen. Trotz der relativ geringen Phosphormenge, die wir dem Tier einverleibten, starb das Meerschweinchen zwei Tage nach der letzten Phosphorinjektion. Bei diesem Versuchstier hat der *Gesamtstickstoff*

¹ Vgl. Tabelle I.

Tabelle IV¹.
Phosphorvergiftetes Meerschweinchen, Gewicht 300 g.
Tagesmenge enthält:

Datum 1934	Harn- volumen in 24 Std. ccm	Gesamt-N g	Imid- azol-N mg	Histidin- N mg	Injektionen:		Bemerkungen
					l-Histidin- chlorhydrat mg	Phos- phor mg	
8. V.	100	0,30	1,4	0	—	—	In der Nacht auf den 17. V. 1934: Exitus
9. V.	87	0,33	0,9	0	—	—	
10. V.					—	—	
11. V.					—	—	
12. V.	58	0,44	3,6	0	—	1,0	
13. V.					—	—	
14. V.					200	1,0	
15. V.	42	0,45	11,2	4,6	200	—	
16. V.					200	—	

des Harnes eine leichte Steigerung erfahren. Der *Imidazolstickstoff* hat ebenfalls zugenommen, besonders stark kurz vor dem Tode des Tieres. Im letzten Harn konnten wir analog wie beim ersten phosphorvergifteten Meerschweinchen Histidin, hier sogar in größerer Menge, bestimmen. Da bei den beiden letztgenannten Versuchen die Tiere sehr bald an der Phosphorvergiftung zugrunde gingen, unternahmen wir noch einen dritten Versuch mit folgender Anordnung: zwei im Stoffwechsellkäfig befindlichen, fast gleich großen Meerschweinchen wurden täglich äußerst kleine Phosphormengen subcutan injiziert. Wir gingen hierbei von 0,2 mg Phosphor aus und steigerten diese Dosis allmählich auf 2 mg. Dem einen Tier brachten wir außerdem täglich 200 mg Histidinchlorhydrat subcutan bei. Beide Tiere starben in derselben Nacht nach der zweiten Injektion von 2 mg Phosphor. Die Harnen beider Meerschweinchen wurden wie gewöhnlich aufgearbeitet.

Der *Gesamtstickstoff* der Versuchstiere (vgl. Tabelle V und Va) nimmt mit der fortschreitenden Phosphorvergiftung zuerst zu und dann wieder ab. Die *Imidazolstickstoffausscheidung* schwankt beim Kontrolltier ganz unregelmäßig und erfährt erst knapp vor dem Tode des Tieres eine erhebliche Steigerung, im *letzten Harn* dieses Tieres konnte sogar *Histidin*, wenn auch nur *spurenweise*, nachgewiesen werden.

Beim eigentlichen Versuchstier (Tabelle Va) nimmt der *Imidazolstickstoff* schon zu Beginn des Versuchs bedeutend zu, stellt sich dann auf einen konstanten, hohen Wert ein (rund 9 mg in der Tagesmenge), um schließlich knapp vor dem Tode des Tieres eine Steigerung auf mehr als das doppelte dieses Wertes zu erfahren.

¹ Vgl. Tabelle I.

Tabelle V¹.

Phosphorvergiftetes Meerschweinchen, Gewicht 420 g.
Tagesmenge enthält:

Datum 1934	Harn- volumen in 24 Std. ccm	Gesamt-N g	Imidazol-N mg	Histidin-N mg	Injektionen von Phosphor mg	Bemerkungen
22. V.	83	0,45	2,1	0	—	Das Oleum phosphoratum 1:1000 wurde mit Olivenöl fünffach ver- dünnt
23. V.					—	
24. V.	93	0,45	1,9	0	0,2	
25. V.					0,2	
26. V.					0,3	
27. V.	80	0,42	5,8	0	—	
28. V.					0,3	
29. V.	115	0,60	1,5	0	0,4	
30. V.					0,6	
31. V.					0,6	
1. VI.	68	0,39	1,6	0	0,6	
2. VI.					1,0	
3. VI.	75	0,42	1,5	0	—	
4. VI.					1,0	
5. VI.					40	0,19
6. VI.	2,0					
						In der Nacht auf den 7. VI. 1934: Exitus

Entsprechend den Beobachtungen bei den schon erwähnten phosphorvergifteten und mit Histidin behandelten Tieren wurde auch hier im letzten Harn vor dem Tode des Meerschweinchens Histidin, und zwar in ziemlich beträchtlicher Menge, festgestellt. Zieht man übrigens vom letzten Imidazolstickstoffwerte (siehe Tabelle Va, 22,5 mg) diesen Histidinstickstoffwert ab, so ergibt sich eine Imidazolstickstoffzahl, die derjenigen der vorhergehenden Harne vollkommen entspricht, so daß man annehmen kann, daß der hohe Imidazolstickstoffwert des letzten Harnes hauptsächlich durch die Ausscheidung von Histidin bedingt ist.

Masslow² hat in O. Fürths Laboratorium bei zwei phosphorvergifteten Hunden die Ausscheidung des Diazochromogens im Harn mittels der Reaktion von Weiss und Ssobolew verfolgt und hat hierbei eine Verdoppelung des Diazochromogenwertes gegenüber der Norm beobachtet. Allerdings lassen sich diese Ergebnisse nicht direkt mit den unserigen vergleichen, weil Masslow die Diazoreaktion im nativen Harn anstellte und hierbei bekanntlich nicht nur Imidazolkörper, sondern auch aromatische Oxy Säuren, wie z. B. das Tyrosin, die Diazoreaktion bedingen können. In unseren Versuchen wurde die Diazoreaktion grundsätzlich in der Hopkinsschen Fraktion durchgeführt.

Zusammenfassend läßt sich folgendes aussagen: Das normale Meerschweinchen baut subcutan injiziertes l-Histidinmonochlorhydrat vollkommen ab, wobei eine ganz geringfügige Steigerung des normalen

¹ Vgl. Tabelle I. — ² Diese Zeitschr. 70, 306, 1915.

Tabelle Va¹.
Phosphorvergiftetes Meerschweinchen, Gewicht 400 g.
Tagesmenge enthält:

Datum	Harn- volumen in 24 Std.	Gesamt-N	Imid- azol-N	Histidin- N	Injektionen:		Bemerkungen
					1-Histidin- chlorhydrat	Phos- phor	
1934	ccm	g	mg	mg	mg	mg	
22. V.	45	0,26	1,6	0	—	—	Das Oleum phosphoratum 1:1000 wurde mit Olivenöl fünffach ver- dünnt
23. V.					—	—	
24. V.	88	0,28	2,8	0	—	0,2	
25. V.					200	0,2	
26. V.	70	0,42	9,4	0	200	0,3	
27. V.					—	—	
28. V.	143	0,56	9,1	0	200	0,3	
29. V.					200	0,4	
30. V.	83	0,37	9,9	0	200	0,6	
31. V.					200	0,6	
1. VI.	73	0,41	5,8	0	200	0,6	
2. VI.					200	1,0	
3. VI.	63	0,44	22,5	13,0	—	—	Ein Teil der am 2. VI. 1934 inji- zierten Histi- dinmenge floß wieder aus
4. VI.					200	1,0	
5. VI.	63	0,44	22,5	13,0	200	2,0	
6. VI.					200	2,0	

In der Nacht auf
den 7. VI. 1934:
Exitus

Imidazolstickstoffwertes zu verzeichnen ist. Zwischen dem *trächtigen und dem nichtträchtigen Meerschweinchen* ergibt sich bezüglich des Verhaltens gegenüber dem injizierten 1-Histidinmonochlorhydrat keinerlei Unterschied. Das *phosphorvergiftete Meerschweinchen* baut zunächst ebenfalls das einverleibte Histidinchlorhydrat vollkommen ab, erst knapp vor dem Tode des Tieres erscheint unverändertes Histidin im Harn. Offenbar wird die Leber des Tieres durch die fortschreitende Phosphorvergiftung derart schwer geschädigt, daß sie nicht mehr fähig ist, das gesamte zugeführte Histidin vollständig zu zerstören. Desgleichen erscheint der *Imidazolstickstoffwert* des Harns beim phosphorvergifteten, mit Histidin behandelten Meerschweinchen gegenüber der Norm stark erhöht.

Zusammenfassung.

Einem normalen, einem trächtigen und einigen phosphorvergifteten Meerschweinchen wurde 1-Histidinmonochlorhydrat subcutan injiziert und der Harn auf die *Gesamtstickstoff-, Imidazolstickstoff- und Histidinstickstoffausscheidung* hin untersucht. Die erhaltenen Resultate finden sich in einzelnen Tabellen zusammengefaßt und werden diskutiert.

¹ Vgl. Tabelle I.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses.

	Seite
Winter, K. Anton. Der Gesamtechloridgehalt neugeborener Ratten	384
Péter, F. Analyse der Wirkung der Hypophysenvorderlappenhormone auf den O ₂ -Verbrauch	387
Chrzaszcz, Tadeusz und Józef Janicki. Der Einfluß von Papain auf die amylolytische Kraft verschiedener Getreidearten	402
Issekutz, B. v. und J. Szende. Die Wirkung des Insulins auf die Zuckerproduktion der überlebenden Froschleber	412
Hofmann, Eduard. Vorkommen von Maltase und Saccharase bei Schizo-Saccharomyces octosporus (Beijerinck) und deren Trennung	417
Hofmann, Eduard. Untersuchungen über verschiedene Pflanzen-emulsine	426
Cattaneo, Carlo. Über die enzymatische Spaltung der Cellobiose-carbonsäure	430
Schuchardt, W. und A. Vercellone. Abbau der linksdrehenden Mono-phosphoglycerinsäure durch frische untergärige Hefe	434
Schuchardt, W. und A. Vercellone. Weiteres über die Vergärung der Glycerinsäure-diphosphorsäure durch Hefe	435
Schuchardt, W. und A. Vercellone. Verhalten von optisch aktiver Mono- und Di-phosphoglycerinsäure gegenüber Erythrocyten verschiedener Herkunft	437
Cattaneo, Carlo und Carl Neuberg. Umstellung der Coli-gärung auf reine Milchsäuregärung	441
Neuberg, Carl und Maria Kobel. Weiteres über Auftreten von Triose beim desmolytischen Hexosenabbau durch Mikroben und höhere Pflanzen	445
Neuberg, C. und M. Kobel. Umwandlung von Phosphoglycerinsäure durch die Fermente gekeimter Erbsen und Bohnen	457
Neuberg, Carl und Maria Kobel. Rein chemische Überführung der Glycerinsäure und Glycerinsäure-mono-phosphorsäure in Brenztraubensäure	459
Neuberg, C. und M. Kobel. Kristallisierte und gelatinöse Salze der Glycerinsäure-mono-phosphorsäure	461

Fortschritte in der anorganisch-chemischen Industrie

dargestellt an Hand der Deutschen Reichspatente

Herausgegeben von **Adolf Bräuer** und **J. D'Ans**

Bearbeitet mit Unterstützung von **Josef Reitstötter**
und unter Mitwirkung anderer Fachgenossen

Vierter Band (1928—1932.) Mit zahlreichen Textabbildungen

Kürzlich erschien: 1. Abteilung. IV, 892 Seiten. 1934 RM 128.—
2. und 3. Abteilung In Bearbeitung

Der vierte Band der „Fortschritte“ wird die deutschen Reichspatente der Jahre 1928 bis einschließlich 1932, die Verfahren zur Darstellung anorganischer Stoffe zum Gegenstand haben, umfassen. Er wird im Laufe dieses Jahres in drei Abteilungen erscheinen. Die vorliegende erste Abteilung umfaßt die Gruppen Wasserstoff, Halogene, Sauerstoff und Schwefel.

Erster Band (1877—1917). Mit zahlreichen Textabbildungen
Erster Teil. VIII, 1184 Seiten. 1921 RM 149.—
Zweiter Teil. IV, 1444 Seiten. 1922 RM 181.—
Dritter Teil. IV, 1286 Seiten. 1923 RM 162.—

Zweiter Band (1918—1923). Mit zahlreichen Textabbildungen
Erster Teil. IV, 1196 Seiten. 1925 RM 150.—
Zweiter Teil. IV, 936 Seiten. 1926 RM 118.—

Dritter Band (1924—1927). Mit zahlreichen Textabbildungen
Erste Abteilung. IV, 300 Seiten. 1928 RM 36.—
Zweite Abteilung. IV, 416 Seiten. 1928 RM 56.—
Dritte Abteilung. IV, 436 Seiten. 1930 RM 58.—
Vierte (Schluß-)Abteilung. VII, 372 Seiten. 1930 RM 58.—

(Die Abnahme eines Teiles verpflichtet zur Abnahme eines ganzen Bandes)

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN

Ergebnisse der Physiologie und experimentellen Pharmakologie

Begründet von **L. Asher** und **K. Spiro** †.

Herausgegeben von **L. Asher**, Bern, **O. Kroyer**, Berlin, **H. Rein**, Göttingen, **P. Rona**, Berlin.

Fünfunddreißigster Band.

Mit 117 Abbildungen. V, 1065 Seiten. 1933.

RM 124.—

Inhaltsverzeichnis:

- Max von Frey.** Von Professor Dr. H. Rein, Göttingen.
Graham Lusk. Von Professor Dr. E. F. du Bois.
Olof Hammarsten. Von Professor Dr. T. Thunberg.
Gustav Embden. Von Dr. H. J. Deuticke.
Probleme der Histophysiologie. Von Professor Dr. A. Noll, Jena.
Die chemischen Vorgänge bei der Gewebeskultur. Von Dr. A. Fischer, Kopenhagen.
Neuere Methoden der organischen Chemie in der Physiologie. Von Dr. H. Willstaedt, Uppsala.
Die chemische Erforschung der Naturfarbstoffe I. Von Privatdozent Dr. E. Bergmann, Rechoboth (Palästina).
Zur Biochemie des Testikelhormons. Von Dr. K. Tscherning, Danzig.
Das weibliche Sexualhormon (Follikel- und Brunsthormon). Von Dr. Inge Störmer und Dr. U. Westphal, Göttingen-Danzig.
Der weibliche Genitalzyklus. Von Dr. Lore Marx, Karlsruhe.
Das Vitamin C. Von Dr. O. Rygh, Oslo.
Neuere Untersuchungen über die Anwendung von Enzymen zur Konstitutionsermittlung der Proteine. Von Dr. K. Linderström-Lang, Kopenhagen.
Untersuchungen über die chemische Natur der Fermente (ohne die häminhaltigen Fermente). Von Privatdozent Dr. W. Langenbeck, Münster i. W.
Häminhaltige Fermente. Von Dr.-Ing. K. Zeile, München.
Vergleichender Fermentstoffwechsel der niederen Tiere. Von Professor Dr. P. Krüger, Wien.
Neuere Ergebnisse der vergleichenden Physiologie der Verdauung der Säugetiere. Von Privatdozent Dr. W. Lenkeit, Berlin.
Physiologie der Herztöne (Ergebnisse der Herzschallschreibung). Von Privatdozent Dr. E. Schütz, Berlin.
Recent Advances in the Chemistry of certain Blood Constituents. By Professor Dr. C. Rimington, Pretoria (South Africa).
The All-or-Nothing Reaction. By Professor Dr. E. D. Adrian, Cambridge.
Zur Lehre vom Elektrotonus. Von Professor Dr. U. Ebbecke, Bonn a. Rh.
Das Messen auf dem Gebiete der Propriozeptiv- und der Berührungsempfindungen. Von Professor Dr. Y. Renqvist, Helsinki (Finnland).
Die chemischen Vorgänge bei der Muskelkontraktion. Von Privatdozent Dr. E. Lehnartz, Frankfurt a. M.
Permeability in Large Plant Cells and in Models. By Dr. W. J. V. Osterhout, New York.
Namen- und Sachverzeichnis. — Inhalt der Bände 31—35.

VERLAG VON J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN

6

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 13

25. AUGUST 1934

Nr. 34, S. 1220

ZUR FRAGE DER HISTIDINURIE BEI DER GRAVIDITÄT.

Von

REGINE KAPELER-ADLER und HEINZ HERRMANN.

Mit Rücksicht auf die Feststellung der einen von uns, daß Harn gravider Frauen ausnahmslos Histidin enthalten, so daß auf diese Tatsache ein chemischer Schwangerschaftsnachweis¹ gegründet werden konnte, erschien es von Interesse, Harn verschiedener *trächtiger Tiere* auf Histidin zu untersuchen. Wir bedienten uns hierbei der gleichen Methode, wie sie ursprünglich bei der Prüfung von Gravidenharnen zur Anwendung gelangte².

Wir zogen die Harn folgender *trächtiger Tiere* zur Untersuchung heran: Von 3 Meerschweinchen, 2 Kaninchen, 2 Katzen, 2 Hunden, 2 Stuten und 1 Äffin (*Macacus rhesus*).

Auffallenderweise konnte in keinem einzigen der untersuchten Harn der erwähnten trächtigen Tiere auch nur die kleinste Spur von Histidin nachgewiesen werden. Es scheint also bezüglich der Histidinurie ein *wesentlicher Unterschied* zwischen der *menschlichen* und *tierischen Gravidität* zu bestehen.

Dieses Ergebnis erscheint auch noch in einem anderen Zusammenhang nicht uninteressant. Bekanntlich beruht die biologische Schwangerschaftsdiagnose von ZONDEK-ASCHHEIM³ bei der menschlichen Gravidität auf dem Nachweis des Hypophysenvorderlappensexualhormons, des Prolans, im Harn. ZONDEK⁴ konnte nun nachweisen, daß der *Harn trächtiger Tiere* zum Unterschied von demjenigen gravider Frauen *kein Prolan* enthalte.

Da wir im Harn trächtiger Tiere auch kein Histidin auffinden konnten, glauben wir vermuten zu können, daß zwischen der Prolan- und der Histidinausscheidung ein gewisser Parallelismus bestehe.

Auf folgende Beobachtung sei ferner hingewiesen: Unsere Untersuchung des Harnes einer graviden *Macacusäffin* auf Histidin lieferte sowohl im 3. als auch 5. Schwangerschaftsmonat ein *negatives Resultat*. Dieses Ergebnis fiel uns des-



wegen auf, weil ZONDEK⁵ angibt, daß der Harn trächtiger Äffinnen ebenso wie derjenige gravidierender Frauen Prolan enthalte, und wir in allen bis nun untersuchten Graviditätsfällen, wie schon oben erwähnt, eine Analogie zwischen der Prolan- und Histidinausscheidung beobachten konnten. Wir ließen daher bei der von uns auf Histidinurie untersuchten Äffin im gleichen Material die Zondek-Aschheimsche Reaktion durchführen. Beide Male lieferte die Z.-A.-Reaktion ein negatives Ergebnis.

Dieselbe Feststellung haben übrigens auch ALLEN, MADDUX und KENNEDY⁶ bei der Prüfung des Harnes einer trächtigen Äffin (*Macacus rhesus*) machen können. Fortlaufende Untersuchungen des Harnes dieser Äffin auf Prolan zwischen dem 2. und 5. Graviditätsmonat ergaben durchweg ein negatives Resultat. Bei Versuchen mit *Macacus*-Äffinnen gelangten ferner SNYDER und WISLOCKI⁷ zu ähnlichen Ergebnissen.

Hier besteht also eine Diskrepanz zwischen den Beobachtungen von ZONDEK und denen anderer Untersucher.

Schließlich möchten wir über folgenden Versuch berichten: Einem im Stoffwechsellager befindlichen Meerschweinchen wurden insgesamt 300 *Prolaneinheiten* an 5 aufeinanderfolgenden Tagen subcutan injiziert und der quantitativ gesammelte Harn auf *Histidin* untersucht. Wir ließen uns hierbei von dem Gedanken leiten, das Prolan könnte eine Histidinausscheidung verursachen, und wir würden auf diesem Wege eine experimentelle *Histidinurie* bewerkstelligen und die Frage nach dem Ursprung des Histidins im Harn gravidierender Frauen beleuchten können. Leider verlief dieser Versuch negativ. (Aus dem Institute für Medizinische Chemie der Universität Wien.)

Literatur: ¹ KAPPELLER-ADLER, *Klin. Wschr.* 1934, 21 — *Wien. klin. Wschr.* 1934, 6. — ² KAPPELLER-ADLER, *Biochem. Z.* 264, 138 (1933). — ³ ZONDEK, *Die Hormone des Ovariums und Hypophysenvorderlappens*. Berlin: Julius Springer 1931. — ⁴ Ebenda, S. 204. — ⁵ l. c. S. 316. — ⁶ *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* 28, 403 (1931) — *Ber. Physiol.* 61, 294 (1931). — ⁷ *Hopk. Hosp. Rep.* 48, 362 (1931) — *Ber. Physiol.* 63, 371 (1931).

Biochemische Zeitschrift

Begründet von C. Neuberg

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden-Halle a. d. S., M. Ascoli-Palermo, L. Asher-Bern, E. Aubel-Paris, A. Bach-Moskau, G. Barger-Edinburgh, M. Bergmann-New York, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, Fr. Boas-München, J. Bodnár-Debreczen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, T. Chrzaszcz-Posen, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, R. Ege-Kopenhagen, H. v. Euler-Stockholm, M. Ferreira de Mira-Lissabon, H. Fink-Berlin, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, Cl. Fromageot-Lyon, O. Fürth-Wien, E. Hammarsten-Stockholm, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Stockholm, V. Henri-Lüttich, V. Henriques-Kopenhagen, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Berlin, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, G. Klein-Heidelberg, W. Klein-Bonn, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. d. S., H. Kraut-Dortmund, R. Krimberg-Riga, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, K. Lohmann-Heidelberg, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, A. Mc Kenzie-Dundee, Kurt H. Meyer-Genf, O. Meyerhof-Heidelberg, L. Michaelis-New York, H. Molisch-Wien, W. Nernst-Berlin, K. Noack-Berlin, C. v. Noorden-Wien, Orla-Jensen-Kopenhagen, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, W. H. Peterson-Madison, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Paris, D. N. Prianischnikow-Moskau, St. J. von Przyłęcki-Warschau, A. Rippel-Göttingen, H. Sachs-Heidelberg, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, H. Steenbock-Madison, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, F. Verzár-Basel, A. I. Virtanen-Helsingfors, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

W. Grassmann

Dresden

Sonderabdruck aus 280. Band, 3.—4. Heft

Regine Kapeller-Adler und Fritz Haas:

Über den Ursprung des Histidins im Harn gravider Frauen



Berlin

Verlag von Julius Springer

1935



Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt RM 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber:

Herrn Prof. Dr. W. Grassmann, Dresden 24, Wielandstraße 2,

zu richten.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Autoren erhalten eine *Fahnenkorrektur*. Revisionen können nur ausnahmsweise verabfolgt werden und verursachen oft eine Zurückstellung der Mitteilung. Auf Wunsch der in weit entfernten oder überseeischen Ländern wohnenden Mitarbeiter wird die Korrektur ihrer Abhandlung hier gelesen, wodurch ein beschleunigtes Erscheinen ermöglicht wird.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle RM 30.— für eine Arbeit.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 40 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum gleichen Preise berechnet werden, den die Arbeit im Heft kostet, da die umfangreiche Versendung von Sonderdrucken den Absatz der Zeitschrift schädigt. Dissertations-exemplare werden von der Verlagsbuchhandlung grundsätzlich nicht geliefert.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

280. Band

Inhaltsverzeichnis

3.—4. Heft

	Seite
Haarmann, Walter. Über die Milchsäurebildung in unbestrahltem und bestrahltem Tumorgewebe	173
Maschmann, Ernst und Erica Helmert. Über intracelluläre Proteinasen. XVI. Mitteilung: Weitere Beiträge zur Aktivierung und Hemmung des Papains	184
Maschmann, Ernst. Über intracelluläre Proteinasen. XVII. Mitteilung: Der Einfluß verschiedener Arsenverbindungen auf die Wirksamkeit des Leberkathepsins	204
Gorbach, G. und H. Ruess. Das Hefesaccharase aktivierende Strahlengebiet. (6. Mitteilung der Reihe: Über den Einfluß ultravioletten Lichtes auf Hefesaccharase)	213
Schulz, Fr. N. und Max Becker. Über die Kohlenhydrate der Eiweißdrüse von <i>Rana esculenta</i>	217
Boas, I. Über eine annähernd quantitative Bestimmung der Sterkoporphyrine	227
Kapeller-Adler, Regine und Fritz Haas. Über den Ursprung des Histidins im Harnе gravidier Frauen	232
Rusznýák, St. und E. B. Hatz. Maßanalytische Bestimmung des Hämoglobins	242
Dische, Zacharias. Die Bedeutung der Phosphorsäureester für den Ablauf und die Steuerung der Blutglykolyse. II. Mitteilung: Zerfall des Hexosemonophosphats im hämolysierten Blut nach Phosphorylierung in einer mit der Dephosphorylierung der Adenosin-triphosphorsäure gekoppelten Reaktion	248
Ege, Rich. und Jens Obel. Untersuchungen über die Aktivierung des proteolytischen Enzymogensystems des Ventrikels	265
Lauersen, F. und K. Voit. Zur Methodik der Kohlenstoffbestimmung in biologischen Flüssigkeiten	276
Przyłęcki, St. J. v., W. Giedroyć und H. Rafałowska. Über den Glykogenzustand im Zellinnern. I. Mitteilung: Über Dreikomponenten-Symplexe aus Clupein, Nucleinsäure, Glykogen oder Dextrin	286

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über den Ursprung des Histidins im Harnе gravidеr Frauen.

Von

Regine Kapeller-Adler und Fritz Haas.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 18. Juli 1935.)

I.

Das Histidin, welches *Armstrong* und *Walker*¹ zum ersten Male aus Schwangerenharn isoliert haben, bildet einen *normalen Bestandteil* des *Harns gravidеr Frauen*, ist dagegen sonst weder im normalen noch im pathologischen menschlichen Harnе mit Sicherheit nachzuweisen². Tiere scheiden Histidin überhaupt nicht aus, auffallenderweise auch nicht in der Schwangerschaft³. Diese Histidinausscheidung ist für die menschliche Gravidität derart spezifisch, daß ein chemischer Schwangerschaftsnachweis auf Grund des Auftretens von Histidin im Harnе ausgearbeitet werden konnte.

Die Untersuchung einer überaus großen Zahl von Gravidenharnen ergab, daß Frauen von der vierten bis fünften Graviditätswoche an, während der gesamten Gestationsperiode täglich nicht unerhebliche Histidinmengen ausscheiden, daß diese Exkretion für jede Frau eine verschiedene, individuelle Größe darstelle, und daß weiter die Histidinausscheidung von der *Art der Ernährung* abhängig sei. Eiweißreiche Kost begünstigt die Histidinausscheidung, eiweißarme setzt sie herab. Daß die Histidinexkretion jedoch auch *endogener* Natur sei, dafür spricht die Tatsache, daß bei praktisch histidinfreier Ernährung Histidin im Gravidenharn nie fehlt. Wichtig erscheint ferner die Feststellung, daß l-Histidin, einer Gravidеn per os gereicht, fast unverändert ausgeschieden wurde, während es normalerweise vollkommen abgebaut wird⁴. Schließlich soll nicht unerwähnt bleiben, daß ein gewisser Parallelismus zwischen der Histidinausscheidung und der Ausscheidung von *Prolan* beobachtet werden konnte. Das Einsetzen beider Reaktionen in der Schwangerschaft scheint gleichzeitig zu erfolgen, beide Reaktionen werden im Puerperium negativ und beide fehlen vollkommen im Harn trächtiger Tiere.

Wie kommt es nun zu dieser gewaltigen Histidinurie während der Schwangerschaft? Da, wie schon oben erwähnt, eine Histidinaus-

¹ Biochem. J. 26, 143, 1932. — ² Kapeller-Adler, diese Zeitschr. 264, 131, 1933; Klin. Wochenschr. 1934, S. 21. — ³ Kapeller-Adler u. Herrmann, Klin. Wochenschr. 1934, S. 1220. — ⁴ Kapeller-Adler u. Schiller, Klin. Wochenschr. im Druck.

scheidung im allgemeinen nur in der Gravidität beobachtet wurde, war es naheliegend, zunächst an einen *Zusammenhang zwischen Placenta und Histidinexkretion* zu denken. Unter dieser Annahme war zu erwarten, daß sich die Placenta als sehr histidinreich erweisen werde. Wir untersuchten aus diesem Grunde einige zu diesem Zweck bereitete Placentaextrakte und das Placentaeiweiß. *Freies, vorgebildetes Histidin konnte im Extrakt nicht vorgefunden* werden. Dieser enthielt nach durchgeführter Hydrolyse eine sehr geringe Menge Histidin (4,3 mg-%). Das Placentaeiweiß erwies sich nach der Hydrolyse ebenfalls als relativ histidinarm (0,42 %). Diesen Ergebnissen zufolge konnte an einen Zusammenhang zwischen Placenta und Histidinausscheidung nicht gedacht werden. Mußte man nun den Gedanken an eine Beeinflussung der Histidinausscheidung durch die Placenta fallen lassen, so konnte eine *Erklärung für die Histidinurie* nur mehr im *Stoffwechsel* gesucht werden. Wir legten uns zunächst die Frage vor, was mit dem Histidin im normalen Stoffwechsel geschieht; kommt es doch außer in der Schwangerschaft nie im Harn unverändert zum Vorschein. Offenbar wird das Histidin im gewöhnlichen Stoffwechsel vollkommen abgebaut.

Einen Abbau des Histidins im Stoffwechsel konnte schon *Engeland*¹ beobachten, welcher nach subcutaner Verabreichung von Histidin nur geringe Mengen im Harn wiedergefunden hat. Weiter haben *Abderhalden* und *Einbeck*², *Kotake* und *Konishi*³, *Kijokawa*⁴, *Kapeller-Adler* und *Kohut*⁵ und *Kapeller-Adler* und *Schiller* festgestellt, daß Histidin, sei es per os eingegeben, sei es subcutan injiziert, im Stoffwechsel vollkommen zerstört wird.

Wo vollzieht sich nun dieser Abbau des Histidins? *Krebs*⁶ und *Edlbacher*⁷ konnten in ihren Versuchen zeigen, daß das *Histidin im Gegensatz zu den meisten anderen Aminosäuren* von der Niere nicht oder nur spureneise desaminiert wird. Es ist ein großes Verdienst *Edbachers*⁸, darauf hingewiesen zu haben, daß beim *Abbau des Histidins* die Leber die Hauptrolle spielt, und zwar enthält dieses Organ ein das Histidin spezifisch spaltendes Ferment, das *Edbacher Histidase* nannte. *Edbacher* und Mitarbeiter studierten eingehend die Frage des Histidinabbaues unter dem Einfluß der Histidase und fanden, daß *in vitro* der Imidazolkern des Histidins durch dieses Ferment geöffnet und ein Stickstoff als Ammoniak abgespalten wird. Das entstandene labile Zwischenprodukt spaltet bei alkalischer Reaktion nochmals Ammoniak ab und geht schließlich in Glutaminsäure über. Es entstehen somit schließlich aus 1 Mol Histidin je 1 Mol Glutaminsäure, Ameisensäure und 2 Mole Ammoniak. Die Histidase ist, *Edbachers* ausgedehnten Untersuchungen zufolge, nur in der Leber vorhanden. Der Autor hat dieses Ferment in der Leber von verschiedenen Tieren und von Menschen auffinden können, hingegen in keinem anderen Organ. In der

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 49, 1908. — ² Ebenda 68, 395, 1910. — ³ Ebenda 122, 230, 1922. — ⁴ Ebenda 214, 38, 1933. — ⁵ Diese Zeitschr. 272, 341, 1934. — ⁶ Zeitschr. f. physiol. Chem. 217, 218, 1933. — ⁷ Ebenda 224, 269, 1934. — ⁸ Ebenda 157, 106, 1926; 191, 225, 1930; 195, 267, 1931; 224, 261, 1934.

allerjüngsten Zeit bestätigt *Sahisaka*¹ insofern vollkommen die Ansicht *Edbachers*, als er nachweist, daß der Imidazolkern des Histidins nur durch die Leber völlig aufgespalten werden könne.

War einmal der Weg des Histidinabbaus im normalen Stoffwechsel durch die grundlegenden Arbeiten *Edbachers* gewiesen, so erschien es naheliegend, sich die Frage vorzulegen, wie sich der *Histidinabbau im Stoffwechsel gravider Frauen* vollziehe, bei denen ja unverändertes Histidin im Harn ausgeschieden wird. Sollte vielleicht das verschiedene Verhalten der Histidase in- und außerhalb der Schwangerschaft für das auffallende Auftreten des Histidins im Gravidharn maßgebend sein?

Zur näheren Beleuchtung dieser Frage sollte zunächst im Rahmen dieser Arbeit der Histidasegehalt von *Lebern Nichtgravider* quantitativ untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, welche Menge Histidin 1 g Leber abzubauen vermag.

Was die *Methodik* betrifft, so hielten wir uns im allgemeinen an die von *Edbacher* und Mitarbeitern gegebene Vorschrift. Das zur Untersuchung verwendete wertvolle Material wurde uns liebenswürdigerweise von den Leitern des pathologisch-anatomischen und gerichtlich-medizinischen Instituts überlassen, wofür auch an dieser Stelle unser bester Dank ausgesprochen sei.

Das Verfahren gestaltete sich folgendermaßen: Etwa 20 g möglichst frischer Leber wurden durch den *Hofmeister*schen Zerkleinerungsapparat getrieben und hierauf mit einer Messerspitze Quarzsand gründlich verrieben. Von der so hergestellten äußerst feinen, homogenen Lebersuspension wurde 1 g in ein weites Zentrifugenrohr eingewogen, hierauf mit 5 ccm m/15 Phosphat versetzt und mit n/10 Lauge auf $p_H = 8$ gebracht. Sodann wurden 5 ccm einer 1%igen Histidinlösung (= 50 mg Histidin), welche vorher auf $p_H 8$ gebracht worden war, zugesetzt und das Gemenge mit einem dünnen Glasstab gut verrührt. Nach Zusatz von einigen Tropfen Toluol wurde die Mischung in den Brutkasten gestellt. Von jeder Leber wurden stets einige Parallelbestimmungen angesetzt. Es soll hier hervorgehoben werden, daß an Stelle des Phosphatpuffers Glykokollpuffer nicht verwendet werden darf, da Glykokoll die nachträgliche Histidinbestimmung empfindlich stört und man vollkommen falsche Resultate erhält. Nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank wurde der Leberbrei mit verdünnter Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und die überstehende Flüssigkeit abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit Wasser gründlich gewaschen, das Waschwasser abzentrifugiert und die vereinigten Flüssigkeiten auf ein kleines Volumen (etwa 5 ccm) am Wasserbad eingengt. Nun wurde die Flüssigkeit in einen 20 ccm Meßkolben abfiltriert, der Rückstand mit Wasser gewaschen und das Filtrat bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Je 1 ccm dieser Lösung wurde der kolorimetrischen Histidinbestimmung nach *Kapeller-Adler*² unterworfen. Als Vergleichsflüssigkeit diente 1 ccm einer 2,5⁰/₁₀₀igen Histidinlösung. Die nach dem Kolorimetrieren

¹ Ronas Ber. 80, 515, 1934. — ² Diese Zeitschr. 264, 131, 1933.

erhaltenen Werte ergaben mit 20 multipliziert jene Histidinmenge in Milligrammen, welche von der in 1 g Leber enthaltenen Histidasemenge nicht abgebaut worden war. Nach Subtraktion dieser Zahl von der vorgelegten Histidinmenge (50 mg) resultierte jene Histidinmenge in Milligrammen, welche von 1 g Leber abgebaut worden war.

Wir haben übrigens unter den gleichen Bedingungen zwecks Kontrolle auch eine Niere aufgearbeitet. Histidin wurde von der Niere nicht abgebaut. In der nachfolgenden Tabelle I bringen wir die Ergebnisse, welche wir mittels der oben geschilderten Methode an verschiedenen, von männlichen und weiblichen Leichen stammenden Lebern erzielt haben.

Tabelle I. (Nicht geschädigte Lebern.)

Nr.	Name und Geschlecht	Todesursache	1 g Leber baut von zugesetzten 50 mg Histidin ab	Bemerkung
1	R. B., ♂	Pneumonie	21	
2	A. C., ♂	Duraendotheliom	19,2	
3	N. K., ♂	Apoplexie	16	
4	A. S., ♀	Meningitis tbc.	29,2	
5	R. T., ♀	CO-Vergiftung	13	5 Tage nach dem Tode untersucht
6	K. J., ♀	Aortenstenose	31	36 Std. p. m. untersucht
			24	5 ¹ / ₂ Tage p. m. untersucht
7	A. D., ♀	Ca ventriculi	34	Ohne Toluolzusatz
			29	Mit Toluolzusatz
8	B. F., ♀	Gehirntumor	11,6	Nur 12 Std. im Brutschrank
9	G. U., ♂	Apoplexie	16,7	Nur 12 Std. im Brutschrank
10	S. M., ♀	Ca ventriculi	12	Auffallend hochgradige Atrophie der Ovarien, sehr starke Gesichtsbehaarung

Bei den angeführten zehn Fällen handelt es sich um Lebern teils von Männern, teils von Frauen mit verschiedener Todesursache. *Alle untersuchten Lebern haben Histidin abgebaut.* Sie enthielten also alle das Histidaseferment. Die Menge Histidin, welche von je 1 g Leber abgebaut worden war, schwankte zwischen 12 und 30 mg. Allerdings konnte die eine von den Lebern, welche einen tiefen Histidasegehalt aufwiesen, erst fünf Tage nach dem Tode untersucht werden. Es ist möglich, daß sich hierbei die Histidasewirkung bereits etwas erschöpft hat. Zur näheren Beleuchtung dieser Frage haben wir eine andere Leber unter vollkommen gleichen Bedingungen 36 Stunden und 5¹/₂ Tage post mortem untersucht. Nach 36 Stunden baute 1 g Leber 31 mg und nach 5¹/₂ Tagen 24 mg Histidin ab. In diesem Falle ging die Wirksamkeit nach 5¹/₂ Tagen etwas zurück, so daß es durchaus möglich erscheint, daß

man bei der Aufarbeitung der Leber erst einige Tage post mortem nicht mehr die gesamte Histidasewirkung erfassen kann¹.

Zwei Lebern ließen wir statt der üblichen 24 Stunden nur 12 Stunden im Brutschrank stehen. Die Werte für das abgebaute Histidin waren niedriger als die gewöhnlich gewonnenen, so daß man annehmen muß, daß der 12stündige Aufenthalt im Brutschrank für die Reaktion zu kurz ist.

Weiter haben wir den *Einfluß stärkerer Autolyse* auf die Histidase einer genaueren Betrachtung unterzogen, indem wir zwei Proben einer Leber nebeneinander mit und ohne Toluolzusatz aufarbeiteten. Die Leber ohne Toluolzusatz baute etwas stärker Histidin ab, als diejenige mit Toluol. Es ist möglich, daß zu reichlicher Toluolzusatz das Ferment in seiner Wirksamkeit hemmt. Bei allen von uns angeführten Versuchen setzten wir stets wenige Tropfen Toluol zu. Der *bakterielle Abbau* von Histidin ist nach *Kössler-Hanke*² so geringfügig, daß er bei unserer Methodik außer acht gelassen werden kann.

Bei den in der *Tabelle I* angeführten Fällen handelte es sich um *nicht pathologisch veränderte Lebern*.

Da es immerhin im Bereich der Möglichkeit gelegen war, daß bei *pathologischen Lebern* auch das *Histidaseferment geschädigt sein könnte*, untersuchten wir *einige Fälle mit schweren Leberschädigungen*. In der folgenden *Tabelle II* führen wir die hierbei erzielten Resultate an.

Tabelle II. (Geschädigte Lebern.)

Nr.	Name und Geschlecht	Todesursache	1 g Leber baut von zugesetzten 50 mg Histidin ab	Bemerkung
1	R. M., ♀	Lobulärpneumonie	17	Ältere Stauung der Leber Parenchymatöse Degeneration der Leber
2	Z. F., ♀	Meningitis tbc.	24	
3	D. L., ♂	Lungenabszeß, Coronarthrombose	18,5	Schwere akute Leberstauung
4	L. F., ♂	Lebercirrhose	22,3	Die Leber sehr klein, hart, höckerig, die Läppchenstruktur verschwunden
5	A. O., ♀	Sepsis	25,1	Hochgradige Fettleber Icterus gravis
6	B. D., ♂	Gallenblasenca, in die Leber einwachsend	25	

Interessant ist die Feststellung, daß *sämtliche* in dieser *Tabelle* angeführten *Lebern trotz der offenbar schweren Schädigungen ganz normal Histidin abbauten* (etwa 20 mg pro 1 g Leber). Das Ferment funktionierte

¹ Vgl. auch *Edlbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 191, 230, 1930. —

² J. of biol. Chem. 50, 131, 1922.

also vollkommen normal, auch bei den schwersten Leberdefekten, wie z. B. bei Lebercirrhose.

Da uns zunächst *Lebern von Graviden*, die ja *allein* die *Frage des Histidinstoffwechsels in der Gravidität* entscheiden konnten, nicht zur Verfügung standen, erstreckten wir unsere Untersuchungen auf *Lebern von operativ kastrierten Frauen*. Wir wollten feststellen, ob die *Kastration* einen Einfluß auf die *Histidase* ausübe. Es sei hierbei hervorgehoben, daß *Harne von Kastrierten* auf Grund unserer Untersuchungen vollkommen *histidinfrei* sind.

In der *Tabelle III* führen wir unsere Versuchsergebnisse an.

Tabelle III. (Lebern operativ kastrierter Frauen.)

Nr.	Name	Todesursache	1 g Leber baut von zugewetzten 50 mg Histidin ab	Bemerkung
1	H. K.	Grippepneumonie	31,5	Ovarien im Jahre 1912 exstirpiert, Myomalacie und Schrumpfniere
2	L. M.	Aortenstenose	2,5	Radikalexstirpation 1925 wegen Myom und Ovarialeyste, schwere Fettleber
3	P. F.	Fettgewebsnekrose	23,5	Beide Ovarien 1914 wegen extrauteriner Gravidität exstirpiert
4	B. J.	Ca uteri	17,5	Radikalexstirpation vor 10 Tagen
5	E. L.	Hypertonie	24	Beide Uterusanhänge vor Jahren exstirpiert

Von den fünf untersuchten Lebern von Kastrierten haben vier *vollkommen normal* abgebaut. Warum wir in dem einen Fall nur einen minimalen Abbau konstatieren konnten, können wir nicht begründen. Irgendeine Beeinflussung der Histidasewirkung durch die Kastration geht aus diesen Versuchen nicht hervor.

Unter großen Schwierigkeiten gelang uns schließlich die Beschaffung von einigen *Gravidenlebern*. Die Untersuchungsergebnisse haben wir in der folgenden Tabelle IV zusammengefaßt.

Die Leber der Patientin mit *geplatzter Tubargravidität* hat vollkommen *normal* abgebaut. Auf diesen Fall kommen wir weiter unten nochmals zurück. Hingegen haben *sämtliche anderen Graviden- und Puerperallebern* entweder *nur sehr wenig* oder überhaupt *kein Histidin* abgebaut, im Gegenteil drei von ihnen wiesen sogar *vorgebildetes Histidin* auf (8 bis 16,6 mg pro 1 g Leber).

Das Vorkommen *vorgebildeten Histidins* in den betreffenden Gravidenlebern konnten wir folgendermaßen feststellen: 10 g vom feinen Leberbrei wurden 30 Minuten lang mit m/15 Phosphatpuffer geschüttelt, der Extrakt

Tabelle IV. (Lebern von Graviden und Wöchnerinnen.)

Nr.	Name	Todesursache	1 g Leber baut von zugesetzten 50 mg Histidin ab	1 g Leber enthält Histidin vorgebildet in mg	Bemerkung
1	J. M.	Geplatzte Tubar-gravidität	17,5	—	
2	T. P.	Endocarditis, Hirnödem	4	—	Sectio caesarea, keine Eklampsie, Partus 12 Std. ante mortem. Klinisch: tonisch-klonische Krämpfe
3	H. M.	Pulmonalembolie	5,5	—	47 cm lange ♂, unreife Frucht im Uterus
4	H. V.	Verblutung infolge unbehebbarer Atonie des Uterus	0	10	Rachitisch-enges Becken. Sectio caesarea 24 Std. ante mortem
5	M. H.	Beiderseitiges metapneumonisches Empyem, katarrhalische Tracheobronchitis	0	16,9	4 Tage ante mortem Frühgeburt (8. Monat). Puerperaler Uterus
6	Sch. R.	Ca der Thymusdrüse	0	8	Interruptio gravidit. im 5. Monat, 4 Tage ante mortem

hierauf mit verdünnter Schwefelsäure etwas angesäuert, die überstehende Flüssigkeit abzentrifugiert und auf Histidin untersucht. Als Gegenprobe wurde derselbe Versuch bei Lebern Nichtgravider durchgeführt. In keinem der Fälle wurde Histidin nachgewiesen.

Wichtig erscheint uns die Feststellung, daß die untersuchten Lebern von Graviden aus verschiedenen Schwangerschaftsmonaten stammten. Aus diesen Versuchsergebnissen im Verein mit der Tatsache der stets beobachteten Histidinurie in der Schwangerschaft und in den ersten Tagen des Puerperiums lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Während der *gesamten Gestationsperiode* und im *Puerperium* (mindestens in den ersten Tagen desselben) scheint das *Histidaseferment* mehr oder weniger *vollkommen gehemmt* zu sein, so daß die Leber ihre Fähigkeit, Histidin abzubauen, während dieser Zeit einbüßt. So kommt es zu einer Ausschüttung des sonst in der Leber abgebauten Histidins, welches nun im Harn erscheint. Ist das Ferment vollkommen gehemmt, dann kommt es sogar zu einer Speicherung des Histidins in der Leber; denn nur so läßt sich das Vorkommen vorgebildeten Histidins in den in der Tabelle IV angeführten Lebern erklären.

Diese Resultate erscheinen uns für die Klärung der Frage nach dem Ursprunge des Histidins im Schwangerenharn von besonders großer Bedeutung. Unsere Vermutung, daß für das *Auftreten des Histidins im Gravidenharn* die *Funktionshemmung der Histidase* maßgebend sei,

scheint also richtig zu sein, wenn man in Betracht zieht, daß von sämtlichen untersuchten 21 Lebern Nichtgraviden auch nicht eine einzige Histidin nicht abbaute. Ein präformiertes Vorkommen des Histidins in der Leber konnte außer in der Schwangerschaft oder im Puerperium nirgends beobachtet werden. Die einzige Leber, die gleichfalls eine stark beeinträchtigte Histidasewirkung aufzeigte, war die einer kastrierten Frau. Doch können wir aus diesem Einzelbefund natürlich keine Schlußfolgerung ableiten.

Wie es zum Versagen des Histidaseferments während der Gravidität und im Puerperium kommt und durch welche Faktoren dieser Vorgang gesteuert wird, vermögen wir noch nicht zu sagen. Doch glauben wir auf Grund im Gange befindlicher und noch lange nicht abgeschlossener Untersuchungen annehmen zu können, daß die *Beeinflussung der Histidase* in der *Schwangerschaft hormonal* bedingt sei.

Wie schon oben erwähnt, scheint die Hemmung der Histidase bei allen Graviden nicht vollkommen gleich zu sein; dies geht aus der Tabelle IV hervor, derzufolge zwei Gravidenlebern im Gegensatz zu den anderen Schwangerenlebern, wenn auch nur sehr wenig, so doch immerhin 4 und 5,5 mg Histidin pro 1 g Leber abbauten. Die individuell verschieden große Histidinausscheidung im Harn Graviden könnte nun dahin gedeutet werden, daß das Vermögen, Histidin in der Leber zu stapeln, im Einzelfalle verschieden ist.

Die während der Schwangerschaft ausgeschiedene Histidinmenge kann man sich ohne weiteres aus dem Histidin des Nahrungseiweißes bzw. bei praktisch eiweißfreier Ernährung aus dem eingeschmolzenen Körpereweiß entstanden denken.

Was schließlich den in der Tabelle IV angeführten Fall einer *extrauterinen Gravidität* anlangt, so möchten wir folgendes anführen. Diese Leber hat, obwohl einer graviden Frau entstammend, vollkommen normal abgebaut. Dies erklären wir damit, daß die Histidinreaktion im Harn von Extrauterin graviden nicht immer positiv ist und auch die *Zondek-Aschheim-Reaktion* bekanntermaßen nur bei intakter Frucht positiv ausfällt. Es ist also möglich, daß es sich in diesem Falle um eine schon seit längerer Zeit abgestorbene Frucht gehandelt hat.

II.

Wie verhält sich nun die Histidase bei der *tierischen Gravidität*? *Edlbacher* hat die Histidase in der Leber von verschiedenen Tieren (Hund, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze) nachgewiesen und vermutet, daß sie bei allen Wirbeltieren vorkommt. Im Hinblick auf die Ergebnisse bei den Lebern graviden Frauen untersuchten wir die

Lebern eines trächtigen und nichtträchtigen Meerschweinchens und einer trächtigen und nichtträchtigen Katze. Die Tabelle V enthält die dabei gefundenen Zahlen.

Tabelle V.

Tier		1 g Leber baut vom zugesetzten 50 mg Histidin ab
Meerschweinchen	nichtträchtig	41,4
	trächtig	45,4
Katze	nichtträchtig	50
	trächtig	26

Aus dieser Tabelle geht eindeutig hervor, daß beim *Tier* auch in der *Schwangerschaft* das *Histidaseferment* nicht gehemmt ist. Die Leber des trächtigen Meerschweinchens baute sogar besser ab, als diejenige des nichtträchtigen Tieres. Bei den von uns untersuchten Katzen lagen die Verhältnisse umgekehrt. Dieses Ergebnis erscheint sehr auffällig. Sollte es einen so gewaltigen Unterschied bezüglich der Funktionen des Histidaseferments zwischen der menschlichen und der tierischen Gravidität geben? Diese Frage muß unbedingt bejaht werden, denn nur so läßt es sich erklären, daß es in der menschlichen Schwangerschaft zu einer Histidinurie kommt, während das trächtige Tier auch nicht die geringste Spur Histidin ausscheidet. In diesem Zusammenhang möchten wir daran erinnern, daß die Harnen von trächtigen Tieren ebenfalls kein Prolan (*Zondek-Aschheim-Reaktion*) enthalten. Wir erblicken auch in dieser Tatsache die Bestätigung unserer Annahme, daß für das Auftreten des Histidins im Gravidenharn lediglich das vorübergehende Versagen des Histidaseferments in der Leber maßgebend zu sein scheint. Denn bei trächtigen Tieren, bei denen offenbar die Histidase immer funktioniert, tritt im Harn nie Histidin auf, weil es ja vorher in der Leber abgebaut wird.

Zusammenfassung.

1. *Placentaextrakte* wurden auf vorgebildetes Histidin geprüft. Histidin war nicht nachweisbar. Nach der Hydrolyse wurden 4,3 mg-% Histidin bestimmt. Das Placentaeiweiß enthielt 0,42% Histidin. Zwischen Placenta und Histidinausscheidung besteht kein Zusammenhang.

2. Von verschiedenen Lebern männlicher und weiblicher Individuen wurden Breie nach *Edbachers* Angaben dargestellt und diese auf ihre Fähigkeit, das Histidin abzubauen, untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse finden sich in der Tabelle I zusammengefaßt. 1 g Leber baut aus zugesetzten 50 mg Histidin 12 bis 30 mg ab. Ein

ähnlicher Versuch mit Niere angesetzt, lieferte ein vollkommen negatives Resultat. *Lebern* von Patienten mit *schweren Schädigungen* dieses Organs bauten durchgehend *sehr gut Histidin ab*, und zwar 17 bis 25 mg pro 1 g Leber (Tabelle II). *Lebern* von Frauen nach *operativer Kastration* bauten bis auf eine *Histidin* vollkommen normal ab (17 bis 31 mg pro 1 g Leber).

3. *Lebern* von *Graviden* oder von *Frauen im Puerperium* bauten sehr wenig oder gar kein *Histidin* ab. Die *Histidase*, welche normalerweise das *Histidin* völlig abbaut, scheint *während der Gravidität gehemmt zu sein*, so daß das nichtabgebaute *Histidin* ausgeschüttet wird und im Harn erscheint. Bei manchen *Lebern* kommt es sogar zur *Speicherung von Histidin*, so daß diese *Lebern präformiertes Histidin* enthalten. Die Leber einer Frau mit einer geplatzten Tubargravidität baute *Histidin* normal ab.

4. Bei *trächtigen Tieren*, die keine *Histidinurie* zeigen, baut die *Histidase Histidin* ab. Hier besteht also ein weitgehender Unterschied gegenüber der menschlichen Gravidität.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses.

Seite

Neuberg, C. und W. Schuchardt. Weiteres über kristallisierte und gelatinöse Salze der Phosphoglycerinsäuren	293
Neuberg, C. und M. Kobel. Über den spezifischen Einfluß des Zinks auf die Dismutation des Methylglyoxals	297
Grassmann, W., L. Klenk und T. Peters-Mayr. Zur Kenntnis der Affinitätsverhältnisse tierischer und pflanzlicher Dipeptidase	307

Ergebnisse der Biologie

Herausgegeben von K. v. Frisch, München, R. Goldschmidt, Berlin-Dahlem,
W. Ruhland, Leipzig, H. Winterstein, Istanbul
Redigiert von W. Ruhland, Leipzig

Soeben erschienen: **Zwölfter Band**

Mit 135 Abbildungen. III, 573 Seiten. 1935. RM 59.—; gebunden RM 61.60

Diffusion Processes. By Professor Dr. M. H. Jacobs, Philadelphia, Pa. (USA). — **Der Stoffwechsel der Protozoen.** Von Dr. Th. von Brand, Kopenhagen. — **Multiple Allelie und menschliche Erblehre.** Von Professor Dr. Günther Just, Greifswald. — **Phototropismus und Wachstum der Pflanzen.** Dritter Teil. Von Dr. H. G. du Buy und Dr. E. L. Nuernbergk, Utrecht.

Früher erschienen: **Zehnter Band**

Mit 92 Abbildungen. III, 662 Seiten. 1934. RM 66.—; gebunden RM 68.80

Nestbau und Brutpflege bei Reptilien. Von Professor Dr. W. Wunder, Breslau. — **Das Leben ohne Sauerstoff bei wirbellosen Tieren.** Von Dr. Th. v. Brand, Kopenhagen. — **Die Bedeutung der Vitamine in allgemein biologischer Beziehung.** Von Professor Dr. F. Verzar, Basel. — **Neuere Untersuchungen über die Arbeitsteilung bei Insektenstaaten.** Von Dr. A. Steiner, Bern. — **Die Bedeutung der Luftsäcke für die Atmung der Vögel.** Von Dr. Hans Scharnke, München. — **Phototropismus und Wachstum der Pflanzen.** Zweiter Teil. Von Dr. H. G. du Buy und Dr. E. Nuernbergk, Utrecht. — **Die chemischen Vorgänge beim biologischen Kohlehydratabbau.** Zweiter Teil: Die oxydoreduktive Phase. Von Professor Dr. Karl Wetzels, Leipzig. — **Faktorenkoppelung, Faktorenaustausch und Chromosomenaberrationen beim Menschen.** (Nebst einem einleitenden Abschnitt zu Fragen des höheren Mendelismus beim Menschen.) Von Professor Dr. Günther Just, Greifswald.

Elfter Band

Mit 142 Abbildungen. III, 437 Seiten. 1935. RM 44.—; gebunden RM 46.60

Über den Kreislauf bei den Fischen. Von Professor Dr. E. v. Skramlik, Jena. — **Das Schweben der Wasserorganismen.** Von Dr. W. Jacobs, München. — **Vergleichende Untersuchung des Verhaltens der Wirbeltiere.** Von Dr. W. Fischel, Münster i. Westf. — **Bedingungen für die Metamorphose des Axolotls.** Von Dr. L. Marx, Kopenhagen. — **Physiologie des Zentralnervensystems der Fische.** Von Dr. J. ten Cate, Amsterdam.

Jeder Band enthält ein Namen- und Sachverzeichnis

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN

Beilsteins Handbuch der organischen Chemie

Vierte Auflage

Herausgegeben von der **Deutschen Chemischen Gesellschaft**

Hauptwerk, die Literatur bis 1. Januar 1910 umfassend.

- Bd. 1: Leitsätze für die systematische Anordnung. Acyclische Kohlenwasserstoffe, Oxy- und Oxo-Verbindungen. XXXV, 983 Seiten. 1918. Gebunden RM 128.—
- Bd. 2: Acyclische Monocarbonsäuren und Polycarbonsäuren. VIII, 920 Seiten. 1920. Gebunden RM 116.—
- Bd. 3: Acyclische Oxy-Carbonsäuren und Oxo-Carbonsäuren. X, 938 Seiten. 1921. Gebunden RM 118.—
- Bd. 4: Acyclische Sulfinsäuren und Sulfonsäuren. Acyclische Amine, Hydroxylamine, Hydrazine und weitere Verbindungen mit Stickstoff-Funktionen. Acyclische C-Phosphor-, C-Arsen-, C-Antimon-, C-Wismut-, C-Silicium-Verbindungen und metallorganische Verbindungen. XVI, 734 Seiten. 1922. Gebunden RM 94.—
- Bd. 5: Cyclische Kohlenwasserstoffe. VI, 796 Seiten. 1922. Gebunden RM 100.—
- Bd. 6: Isocyclische Oxy-Verbindungen. X, 1285 Seiten. 1923. Gebunden RM 162.—
- Bd. 7: Isocyclische Mono-oxo-Verbindungen und Poly-oxo-Verbindungen. VIII, 955 Seiten. 1925. Gebunden RM 128.—
- Bd. 8: Isocyclische Oxy-Oxo-Verbindungen. VIII, 616 Seiten. 1925. Gebunden RM 80.—
- Bd. 9: Isocyclische Monocarbonsäuren und Polycarbonsäuren. XI, 1063 Seiten. 1926. Gebunden RM 160.—
- Bd. 10: Isocyclische Oxy-Carbonsäuren und Oxo-Carbonsäuren. XII, 1124 Seiten. 1927. Gebunden RM 164.—
- Isocyclische Reihe.**
- Bd. 11: Sulfin- und Sulfonsäuren. Selenin- und Selenonsäuren. IX, 443 Seiten. 1928. Gebunden RM 90.—
- Bd. 12: Monoamine. VIII, 1436 Seiten. 1929. Gebunden RM 260.—
- Bd. 13: Polyamine. Oxy-Amine. X, 903 Seiten. 1930. Gebunden RM 190.—
- Bd. 14: Oxo-Amine, Amino-Carbonsäuren, Amino-Sulfinsäuren, Amino-Sulfonsäuren. XIII, 937 Seiten. 1931. Geb. RM 198.—
- Bd. 15: Hydroxylamine, Hydrazine. XI, 724 Seiten. 1932. Gebunden RM 150.—
- Bd. 16: Azo-, Diazoverbindungen, Triazane, Triazene, Tetrazane, Tetrazene, Pentazadiene, Oktatriene. C-Phosphor-, C-Arsen-, C-Antimon-, C-Wismut-, C-Silicium-Verbindungen usw.; metallorganische Verbindungen. XXII, 1040 Seiten. 1933. Gebunden RM 212.—
- Heterocyclische Reihe.**
- Bd. 17: Verbindungen mit 1 cyclisch gebundenem Sauerstoffatom, Stammkerne, Oxy-Verbindungen. Mono- und Poly-Oxo-Verbindungen. X, 617 Seiten. 1933. Gebunden RM 128.—
- Bd. 18: Verbindungen mit 1 cyclisch gebundenem Sauerstoffatom, Oxy-Oxo-Verbindungen, Carbonsäuren, Sulfonsäuren, Amine usw. XIV, 701 Seiten. 1934. Gebunden RM 144.—
- Bd. 19: Verbindungen mit 2 und mehr cyclisch gebundenen Sauerstoffatomen. XIX, 500 Seiten. 1934. Gebunden RM 106.—
- Bd. 20: Verbindungen mit 1 cyclisch gebundenem Stickstoffatom. Stammkerne. XI, 566 Seiten. 1935. Gebunden RM 119.—
- Bd. 21: Verbindungen mit 1 cyclisch gebundenem Stickstoffatom. Oxy-Verbindungen. Oxo-Verbindungen. Oxy-Oxo-Verbindungen. XVI, 677 Seiten. 1935. Gebunden RM 141.—

Erstes Ergänzungswerk, die Literatur von 1910—1919 umfassend.

- Bd. 1: Ergänzung des 1. Bandes des Hauptwerkes. XIV, 492 Seiten. 1928. Geb. RM 76.—
- Bd. 2: Ergänzung des 2. Bandes des Hauptwerkes. X, 355 Seiten. 1929. Geb. RM 70.—
- Bd. 3 u. 4: Ergänzung des 3. u. 4. Bandes des Hauptwerkes. XVIII, 662 Seiten. 1929. Gebunden RM 130.—
- Bd. 5: Ergänzung des 5. Bandes des Hauptwerkes. XIII, 417 Seiten. 1930. Geb. RM 88.—
- Bd. 6: Ergänzung des 6. Bandes des Hauptwerkes. XV, 642 Seiten. 1931. Geb. RM 128.—
- Bd. 7 u. 8: Ergänzung des 7. u. 8. Bandes des Hauptwerkes. XVI, 820 Seiten. 1931. Gebunden RM 162.—
- Bd. 9: Ergänzung des 9. Bandes des Hauptwerkes. XV, 476 Seiten. 1932. Geb. RM 100.—
- Bd. 10: Ergänzung des 10. Bandes des Hauptwerkes. XVI, 571 Seiten. 1932. Geb. RM 118.—
- Bd. 11 u. 12: Ergänzung des 11. u. 12. Bandes des Hauptwerkes. XVI, 608 Seiten. 1933. Gebunden RM 125.—
- Bd. 13 u. 14: Ergänzung des 13. u. 14. Bandes des Hauptwerkes. XX, 839 Seiten. 1933. Gebunden RM 173.—
- Bd. 15 u. 16: Ergänzung des 15. u. 16. Bandes des Hauptwerkes. XXX, 649 Seiten. 1934. Gebunden RM 138.—
- Bd. 17—19: Ergänzung des 17.—19. Bandes des Hauptwerkes. XXX, 901 Seiten. 1934. Gebunden RM 189.—

Verlag von Julius Springer in Berlin

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 14

14. DEZEMBER 1935

Nr. 50, S. 1790/1792

**ÜBER DIE HISTIDINAUSSCHIEDUNG IN DER
 SCHWANGERSCHAFT UNTER DEM EINFLUSS
 VERSCHIEDENARTIGER ERNÄHRUNG.**

Von

REGINE KAPELLER-ADLER und WALTER SCHILLER.

Aus dem Institut für Medizinische Chemie (Vorstand: Prof. O. FURTH) und der
 Frauenklinik (Vorstand: Prof. W. WEIBEL) der Universität in Wien.

I.

In einigen vorangehenden Mitteilungen¹ konnte die eine von uns feststellen, daß das Histidin einen integrierenden Bestandteil des *menschlichen Gravidenharnes*, nicht aber des Harnes trächtiger Tiere bildet. Was nun die Größenordnung des bei den einzelnen graviden Frauen zur Ausscheidung gelangenden Histidins betrifft, so wurde beobachtet, daß die absolute Menge nicht nur individuell verschieden groß war, sondern daß sie auch bei ein und derselben Frau nicht konstant blieb. Aus diesen Betrachtungen ergab sich eine Fülle von Fragen, von denen bisher nur ein Teil angeschnitten werden konnte.

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollte vor allem die Histidinausscheidung während der *verschiedenen Stadien* der Gravidität untersucht, ferner sollte festgestellt werden, welchen Einfluß die *Ernährung* auf die Histidinexkretion während der Schwangerschaft ausübe.

Bei einer Graviden B. L. wurde die Histidinausscheidung während der gesamten Gestationsperiode verfolgt. Bemerkenswert ist, daß die Ausscheidung von Histidin gleichzeitig mit jener von Prolan (Zondek-Aschheim-Reaktion) einsetzte, und zwar zu Beginn der 5. Graviditätswoche. Die Kost war, wo nichts Besonderes in der Kurve 1 vermerkt ist, eine gemischte. Zur Untersuchung gelangten aliquote Teile des jeweiligen 24stündigen Mischharnes, der zur besseren Haltbarkeit mit etwas Chloroform versetzt worden war. Das Histidin wurde nach der früher gegebenen Vorschrift² quantitativ bestimmt. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß diese Methode von sämtlichen Imidazolderivaten nur das Histidin ganz spezifisch erfaßt.

Die Resultate finden sich in der Kurve 1 dargestellt. Auf der Ordinate wurden die per Tag ausgeschiedenen Histidinmengen, auf der Abszisse die Lunarmonate eingezeichnet.



Bei Betrachtung dieser Kurve fällt vor allem auf, daß die Histidinausscheidung in der zweiten Hälfte der Gravidität eine viel höhere war als in der ersten Hälfte. Während die täglich ausgeschiedene Histidinmenge bis zum Ende des 5. Lunarmonates 1 g nicht überstiegen hat, wurden vom 6. Lunarmonat an fast durchgehend Histidinwerte von über 1 g pro die festgestellt. Weiter geht aus der Kurve hervor,

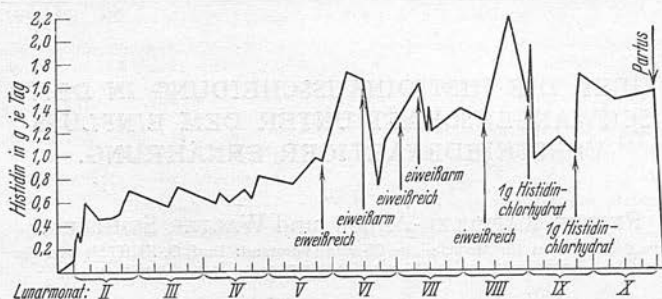


Abb. 1. B. L.

daß *eiweißreiche Kost* die Histidinausscheidung begünstigte, während bei *eiweißarmer* Ernährung weniger Histidin ausgeschieden wird als bei gemischter. So wurde auch einmal nach einer eiweißreichen Kost 2,2 g Histidin im 24-Stunden-Harn bestimmt. *Nucleinreiche Kost* beeinflusst kaum die Histidinausscheidung.

Da es von Interesse erschien, festzustellen, wie sich der Organismus einer *Graviden* zu einer *Zufuhr von reinem Histidin* verhalte, wurde der Versuchsperson am Ende der Schwangerschaft 1 g kristallisiertes l-Histidinchlorhydrat entsprechend 0,739 g Histidin per os gereicht. Die Histidinausscheidung wurde hierbei am Vortage des Versuches, am Versuchstage selbst und an dem darauffolgenden Tage beobachtet. Die Gravide schied nach der Histidineinnahme um 0,5 g Histidin mehr aus als am Tage vorher; demnach wurde das oral zugeführte Histidin bis auf 0,2 g vollkommen unverändert ausgeschieden. Die fehlende geringe Menge könnte möglicherweise zum Teil in Form von Urokaninsäure³ ausgeschieden, zum Teil durch die Magenschleimhaut desaminiert worden sein. Nach SAHISAKA⁴ soll nämlich die Magenschleimhaut 19—34% Histidin abbauen. Derselbe Versuch wurde unter gleichen Bedingungen etwa 3 Wochen später wiederholt. Auch diesmal wurden 0,46 g Histidin mehr ausgeschieden als am Vortage.

Auf Grund dieser beiden Versuche kann man schließen, daß der *gravide Organismus* zugeführtes Histidin größtenteils unverändert ausscheidet. Dieses Ergebnis erscheint um so bemerkenswerter, als *Histidin im normalen Stoffwechsel vollkommen abgebaut wird*, was aus folgenden Versuchen erhellt. Derselben Versuchsperson wurde einige Monate post partum wieder 1 g l-Histidinchlorhydrat per os gereicht und der Harn am Vortage, am Tage des Versuches und am nach-



folgenden Tage auf Histidin untersucht. In keinem der Harne wurde auch nur eine Spur Histidin gefunden.

Um diese Frage noch eingehender zu prüfen, wurde zwei *gesunden jungen Männern* je 1 g 1-Histidinchlorhydrat oral verabreicht. Die Harne wurden, wie oben beschrieben, verarbeitet. Sie erwiesen sich als vollkommen histidinfrei. Histidin wird also normalerweise im Stoffwechsel völlig abgebaut.

In diesem Zusammenhange sei an die Arbeit von⁴ ABDERHALDEN und EINBECK⁵ erinnert, welche Autoren nach Verfütterung von 20 g Histidinchlorhydrat nur mehr 0,4 g derselben Substanz aus dem Hundeharn wiedergewinnen konnten. KOTAKE und KONISHI (l. c.) haben im Hunderversuch sowohl nach Verfütterung als auch nach subcutaner Injektion von großen Mengen Histidinchlorhydrat aus dem Harn nur eine sehr geringe Menge Urokaninsäure (Imidazolacrylsäure) und gar kein Histidin isolieren können. KIJOKAWA hat nach Verabreichung von je 5 g Histidinchlorhydrat an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Kaninchenharn 0,8 g Imidazolacrylsäure, aber kein Histidin bestimmt. In einer Arbeit mit HEINZ KOHUR⁶ konnte die eine von uns durch Versuche an Meerschweinchen ebenfalls zeigen, daß subcutan injiziertes Histidin voll kommen abgebaut werde und nicht die geringste Spur unverändert im Harn erscheine.

Hervorzuheben ist jedoch, daß das *trächtige Meerschweinchen* ebenso wie das *nichtträchtige Tier* imstande ist, einverleibtes Histidin abzubauen. Es scheint also auch bezüglich des Abbaues künstlich zugeführten Histidins derselbe Unterschied zwischen der menschlichen und tierischen Gravidität zu bestehen, wie wir gemeinsam mit HERRMANN⁷ einen solchen betreffs der Histidinurie feststellen konnten.

Was schließlich die letzten Versuchsergebnisse bei der Graviden B. L. anlangt, so sei noch erwähnt, daß am 3. Tage post partum die Histidinausscheidung vollkommen sistiert hat.

II.

Das Studium der Histidinausscheidung bei der Graviden B. L. zeigte, daß die im Harn während der Schwangerschaft auftretende Histidinmenge sicherlich zum Teil von der Art der Ernährung abhängig sei. Es lag also nahe, zu vermuten, daß das im Gravidenharn ausgeschiedene Histidin teils endogenen, teils exogenen Ursprungs sei. Zur näheren Beleuchtung dieser Frage wurden folgende Versuche unternommen. 3 graviden Frauen ließen wir während 28 Tage eine ganz bestimmte Kost verabreichen und verfolgten während dieser Zeit genau die Histidinausscheidung. Es wurden 7 Kostperioden, jede bestehend aus 4 Tagen, in folgender Reihenfolge festgesetzt: 1. *gemischt*, 2. *eiweißreich*, 3. *fleischfrei*, 4. *eiweißreich*, 5. *fleischfrei*, 6. *purinreich*, 7. *gemischt*.

Während der *eiweißreichen Kostperiode* wurde den Graviden täglich je 30 dkg Fleisch, 10 dkg Salami, Käse und Eier, während der

fleischfreien viel Gemüse und Mehlspeisen gereicht. Als purinreiche Kost erhielten die Graviden reichlich Nierenbraten, Milz, Bries und viel Leber. Alle 3 Graviden befanden sich zur Zeit des Versuches im 9. Lunarmonat. Täglich wurden Proben des 24stündigen Mischharns quantitativ auf Histidin untersucht. In den folgenden Kurven haben wir die erzielten Resultate festgehalten.

In der Kurve 2 finden sich die bei der Pat. Sch. G. unter den obigen Versuchsbedingungen erhaltenen Ergebnisse verzeichnet. Auf der Ordinate haben wir die Histidinnengen (in Gramm pro Tag), auf der Abszisse die 7 Kostperioden eingetragen. Was auf den ersten Blick bei der so erhaltenen Kurve auffällt, ist die Tatsache, daß die Histidinausscheidung sogar bei einer und derselben Kost nicht konstant ist, sondern manchmal nicht ganz unerheblich schwankt. Viel größer sind die Unterschiede in der Histidinausscheidung zwischen den einzelnen Kostperioden. Während der ersten Kostperiode (gemischt) betrug die tägliche Histidinexkretion

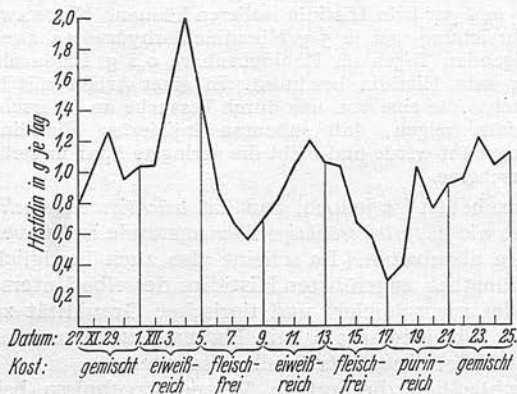


Abb. 2. Sch. G.

im Mittel etwa 1 g. In der darauffolgenden eiweißreichen Periode stieg die Histidinausscheidung jäh auf 2 g pro Tag an, um in der dritten fleischfreien Ernährungsperiode auf etwa 0,6 g abzufallen. Die purinreiche Nahrung verursachte einen sehr mäßigen Anstieg der Histidinausscheidung. Während der letzten gemischten Kostperiode wurden ungefähr die gleichen Ergebnisse erzielt wie in der ersten Kostperiode.

Bei der zweiten Pat. D. M. zeigt sich ein ähnliches Bild mit dem Unterschied, daß die Pat., absolut genommen, mehr Histidin ausschied als die Gravide Sch. G. Ein gewaltiger Anstieg der Histidinausscheidung (über 2 g im Tag) erfolgte in der auf die gemischte Kost folgenden eiweißreichen Periode, während die fleischfreie Kost wieder ein Absinken der Histidinmenge zur Folge hatte. Auch hier hatte die nucleinreiche Ernährung keinerlei besonderen Einfluß auf die Histidinausscheidung.

Vollkommen analog sind die Versuchsergebnisse bei der Graviden W. W., wenn auch von vornherein bemerkt werden muß, daß diese Versuchsperson wenig Histidin im allgemeinen ausschied, so daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Kostperioden nicht sehr deutlich zum Ausdruck kommen. Auch hier fällt vor allem der gewaltige Anstieg der Histidinausscheidung in der eiweißreichen Periode auf.

Vergleicht man die Histidinkurven der 3 Versuchspersonen miteinander, so läßt sich folgendes feststellen: Bei allen 3 Versuchen fällt es auf, daß die *erste eiweißreiche Periode* einen *stärkeren Histidinanstieg* bewirkte als die *zweite*. Eine Erklärung für diese Erscheinung vermögen wir nicht zu geben. Ob dabei die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung eine

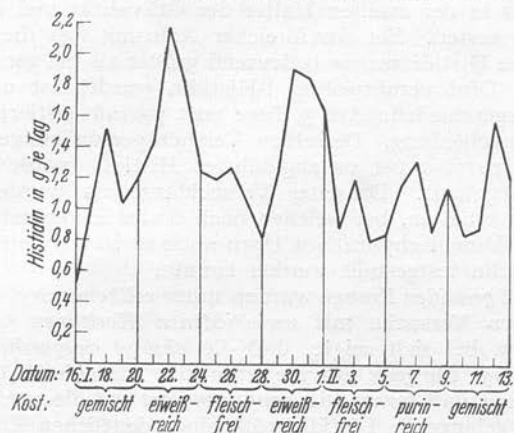


Abb. 3. D. M.

Rolle spielt, müssen wir dahingestellt sein lassen. Daß auch eine endogene Histidinexkretion existiert, geht klar aus der Tatsache hervor, daß auch bei fast eiweißfreier, praktisch histidinfreier Ernährung, die Histidinausscheidung nicht etwa auf einen Nullwert absinkt, sondern noch einen relativ großen, allerdings individuell stark schwankenden Wert aufweist. Die

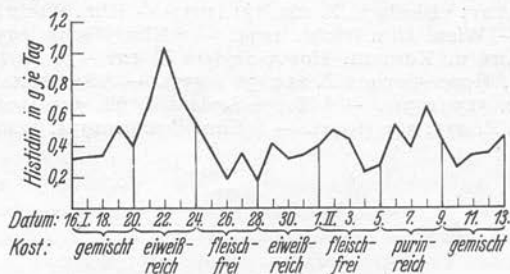


Abb. 4. W. W.

ausgeschiedene Histidinmenge scheint für jede gravide Frau eine ganz spezifische Größe darzustellen. Dafür spricht vor allem die Tatsache, daß die oben besprochenen 3 Frauen an der Klinik während der 28 Versuchstage eine vollkommen gleiche Nahrung verabreicht bekamen und trotzdem ganz differente Histidinmengen ausschieden.

Zusammenfassung: 1. Es wurde die Histidinausscheidung bei einer Graviden während der gesamten Gestationsperiode verfolgt und hierbei folgendes festgestellt: Der Beginn der Histidinausscheidung fiel zeitlich vollkommen zusammen mit dem Einsetzen der Prolanausscheidung, und zwar erfolgte er in der 5. Graviditätswoche. Die ausgeschiedene Histidinmenge war in der zweiten Hälfte der Gravidität viel höher als in der ersten. Bei eiweißreicher Nahrung war die ausgeschiedene Histidinmenge bedeutend größer als bei gemischter Kost. Oral verabreichtes l-Histidin wurde fast unverändert ausgeschieden. Am 3. Tage post partum sistierte die Histidinausscheidung. Derselben Versuchsperson einige Monate post partum per os zugeführtes Histidin wurde vollständig abgebaut. Dasselbe Versuchsergebnis wurde bei 2 Männern erhalten, bei welchen nach oraler Einnahme von je 1 g Histidinchlorhydrat im Harn auch nicht die geringste Spur Histidin festgestellt werden konnte.

2. Bei 3 graviden Frauen wurden unter vollkommen gleichen Bedingungen Versuche mit verschiedenen Kosttypen unternommen, wobei sich zeigte, daß die absolut ausgeschiedene Histidinmenge für jede gravide Frau eine individuelle Größe darstelle und daß ferner die Ernährungsart auf die zur Ausscheidung gelangende Histidingröße einen deutlichen Einfluß ausübe. Das im Harn gravidier Frauen erscheinende Histidin ist teils endogenen, teils exogenen Ursprungs. Sehr eiweißreiche Kost bedingt eine Steigerung, eiweißarme Ernährung eine Senkung der ausgeschiedenen Histidinmenge.

Weiter Untersuchungen über die Frage, welchen physiologischen Faktoren die auffallende Tatsache der Histidinausscheidung in der Schwangerschaft zuzuschreiben sei, sind Gegenstand weiterer, im Gange befindlicher Untersuchungen.

Literatur: ¹ Biochem. Z. 264, 131 (1933) — Klin. Wschr. 1934, 21, 1220 — | Wien. klin. Wschr. 1934. — ² Klin. Wschr. 1934, 21. — ³ KOTAKE u. KONISHI, Hoppe-Seylers Z. 122, 230 (1922). — KIJOKAWA, Hoppe-Seylers Z. 214, 38 (1933). — ⁴ SAHISAKA, Ber. Physiol. 80, 515 (1934). — ⁵ Hoppe-Seylers Z. 68, 395 (1910). — ⁶ Biochem. Z. 272, 341 (1934). — ⁷ Klin. Wschr. 1934, 1220.

Bemerkung zur Arbeit „Franz Földes: Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin“¹.

Von
Regine Kapeller-Adler.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 25. Januar 1936.)

In dieser eben erschienenen Veröffentlichung gibt der Verfasser neben einer Modifikation der *Knoop-Vogeschen* Reaktion und der von mir angegebenen Methode zum Nachweis des Histidins im Schwangerenurine selbst eine „neue Histidinprobe“ für den Harn an.

Hierzu muß folgendes bemerkt werden: Wie der Autor selbst hervorhebt, wird die von ihm angeführte *neue Histidinreaktion weder von reinen Histidinlösungen noch von mit Histidin versetzten Urinproben* gegeben. Es erscheint demnach merkwürdig, daß Herr *Földes* trotzdem diese Reaktion als einen neuen Histidinnachweis für den Harn bezeichnet, da man doch im allgemeinen erst dann imstande ist, einen Stoff mittels einer neuen Reaktion im Harn einwandfrei nachzuweisen, wenn man sich vorher davon überzeugen konnte, daß reine Lösungen des fraglichen Stoffes die Reaktion in spezifischer Weise geben. Nichtsdestoweniger setzt der Autor seine neue Reaktion mit meiner, durch quantitative Bestimmungen an reinen Histidinlösungen vielfach erprobten und mit Analysen an einigen Hunderten Harnen belegten Methode zum Histidinnachweis in Parallele und hält sein Verfahren sogar für empfindlicher.

Es darf vielleicht darauf hingewiesen werden, daß die vom Autor angegebene neue Histidinreaktion, welche darauf beruht, daß Harn nach Zusatz von Brom in essigsaurer Lösung in der *Kälte* eine orangegelbe bis orangefarbene Färbung liefert, von *jedem normalen sowie pathologischen Harn* in größerem oder geringerem Maße gegeben wird und *normale Harnfarbstoffe* anzeigen dürfte. Bekanntlich sind im Harn eine ganze Reihe farblosere Substanzen enthalten, die durch Oxydation in saurer Lösung (in diesem Falle Brom in essigsaurer Lösung) in Farbstoffe übergehen können². Diese von mir gelegentlich der Untersuchung unzähliger Harnen auf Histidin lange vor dem Erscheinen der Arbeit von *Földes* in jedem Urin beobachtete orangefarbene Färbung macht einer schwach zitronengelben Platz, sobald der Harn mit Brom *gesättigt* ist, welcher letzterer Umstand neben dem Erhitzen für das Zustandekommen der Histidinreaktion unbedingt erforderlich ist³. Und gerade die Sättigung des Harns mit Brom und die Verwendung höherer Temperaturen werden von Herrn *Földes* bei seiner neuen Histidinreaktion vermieden.

Mittels dieses neuen Verfahrens hat demnach der Autor sicherlich Histidin nicht erfaßt.

Die *Knoop-Vogesche* Reaktion⁴ zum Nachweis des Histidins besteht darin, daß Harn *nach Sättigen mit sehr verdünntem Bromwasser erhitzt wird*, wobei eine rasch ablassende rote Färbung gebildet wird. Diese Methode

¹ Diese Zeitschr. 283, 199, 1936. — ² *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handb. d. physiol. u. path.-chem. Analyse, Berlin, Springer, 1924, S. 432. — ³ Vgl. auch *Knoop*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. 11, 356, 1908. — ⁴ Brit. med. J. 2, 829, 1929; Proc. roy. Soc. med. 32, 638, 1930.



modifizierte der Autor dahin, daß er den Harn mit einer zur *Sättigung ungenügenden Menge Brom-Essigsäurelösung* schüttelt und daß zum Zustandekommen der Histidinreaktion *notwendige Erhitzen durch vorsichtiges Erwärmen ersetzt*. Dadurch entgeht ihm eventuell vorhandenes Histidin und er erfaßt wie bei seinem eigenen neuen Verfahren wieder nur normale Harnfarbstoffe.

Zu der vom Autor durchgeführten Abänderung meiner Methode zum Nachweis des Histidins im Gravidenharn sei folgendes hervorgehoben. Das von mir angegebene Verfahren¹ besteht darin, daß der zu prüfende Harn *tropfenweise unter ständigem Umschütteln* mit einer 1%igen Bromlösung in Essigsäure bis zur zitronengelben Färbung (Bromsättigung) versetzt wird, wobei man sich durch Tüpfeln auf Jodkalistärkepapier davon überzeugt, daß die Lösung nur einen leisen Überschuß an Brom enthält. Nach Ablauf einer unbedingt erforderlichen Reaktionszeit von etwa 10 Minuten werden 2 bis 3 ccm Ammoniak-Ammoncarbonatreagens zugesetzt und die Lösung für einige Minuten in ein Becherglas mit kochendem Wasser gebracht². Gravidenharn, welche durchweg histidinreich sind, färben sich hierbei rot bis rotviolett, histidinfreie Harn gelb bis hellbraun. Mittels dieser Reaktion habe ich rund 600 Harn Gravider und Nichtgravider untersucht mit einem Fehler von 3 bis 4%.

Das Wesentliche dieser Reaktion besteht darin, daß das Histidin nur *langsam, schrittweise* mit dem Bromreagens gesättigt wird. Setzt man nämlich einer reinen Histidinlösung eine an und für sich kleine Menge Bromlösung nicht tropfenweise, sondern auf einmal hinzu, so ergeben sich, wie ich durch quantitative Untersuchungen feststellen konnte, bedeutende Histidinverluste. Das Histidin ist nämlich gegen *größere Brommengen* schon in der *Kälte* sehr empfindlich und nicht, wie der Autor annimmt, erst in der Hitze. Deswegen muß die von Herrn *Földes* an meiner Histidinreaktion durchgeführte Modifikation, die darin besteht, daß der Autor in zahlreichen Vorproben die zur Sättigung des Harns nötige Brommenge zunächst ermittelt und diese Menge dann dem Harn auf einmal zusetzt, in histidinreichen Harnen unbedingt zu Fehlresultaten führen. Hierbei benutzt der Autor in Anlehnung an eine, am Wesen dieser Histidinreaktion ebenfalls vorbeigehende Arbeit von *M. Weiss*³ nicht eine 1%ige, sondern eine 2½%ige Bromlösung. Der übrige Teil des Verfahrens bleibt im wesentlichen unverändert. Es ist deswegen nicht zu verwundern, daß Herr *Földes* mittels dieser Modifikation, bei welcher das Histidin zerstört werden muß, bei der Untersuchung von Gravidenharnen durchaus schlechte Resultate erhalten hat.

Da mit der neuen Methode von *Földes* und seiner Modifikation der *Knoop-Vogeschen* Reaktion Histidin überhaupt nicht zum Nachweis gelangt, mittels der *Földesschen* Modifikation meiner Methode Histidin nur ganz ausnahmsweise erfaßt werden kann, erübrigt sich eine Diskussion über die vom Autor angeführte Empfindlichkeit dieser Verfahren.

Die vom Autor auf Grund seiner Untersuchungen gezogenen Folgerungen über die Verwertbarkeit des Histidinnachweises im Harn für die Schwangerschaftsdiagnose erscheinen demnach keineswegs stichhaltig und müssen unbedingt abgelehnt werden.

¹ Klin. Wochenschr. 13, 21, 1934. — ² Übrigens setze ich in der letzten Zeit statt 2 bis 3 ccm nur 0,5 ccm Ammoniak-Ammoncarbonatlösung hinzu und erhitze das Reaktionsgemisch genau eine halbe Minute im Becherglas mit kochendem Wasser. — ³ Klin. Wochenschr. 13, 44, 1934.

Schlußbemerkung zur Arbeit: „Franz Földes, Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin“¹.

Von Regine Kapeller-Adler.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 12. März 1936.)

Da der Autor in seiner Erwiderung neuerdings hervorhebt, daß die von ihm zum Histidinnachweis empfohlene Methode „durch das Histidin selbst nicht bedingt wird“, erscheint eine weitere Diskussion gegenstandslos, zumal Methoden existieren, welche die Erfassung des Histidins in eindeutiger Weise gewährleisten. Gerade bei der Untersuchung einer so heterogenen Flüssigkeit, wie sie der Harn darstellt, kann auf Nebenreaktionen — mögen sie auch noch so interessant erscheinen — nicht Rücksicht genommen werden, sondern müssen ausschließlich eindeutige und spezifische Methoden verwendet werden.

Zu den vom Autor als Stützbeweis für seine Resultate zitierten schlechten Ergebnisse anderer Verfasser, welche sich mit der Brauchbarkeit der von mir angegebenen Histidinmethode für den Schwangerschaftsnachweis beschäftigten, sei hervorgehoben, daß neben diesen Arbeiten auch andere bekannt geworden sind, welche über gute Resultate berichten. Zu diesen gehören neben den schon von Földes angeführten Untersuchungen von Alders² und Bodo³ vor allem auch diejenigen von Valle⁴, Chomet⁵, Stern⁶ und Asitaka⁷.

Bei den ersten von mir mit O. Frankl² durchgeführten Untersuchungen gelangte noch die ursprüngliche, mit vielen Fehlern behaftete Methode zur Anwendung, worauf ich schon seinerzeit hingewiesen habe².

Die Diskrepanz in den Befunden der einzelnen Autoren beweist, daß die von mir angegebene Reaktion zur Schwangerschaftsdiagnose trotz ihrer Einfachheit *sehr heikel* ist und demnach ein *sehr sorgfältiges Einhalten der gegebenen Vorschrift*, sowie eine *größere Übung im Beurteilen der Resultate* erfordert. Denn nur so ist es zu erklären, daß einzelne Untersucher gute, andere wieder schlechte Resultate zeitigen konnten.

Im übrigen wird demnächst eine *genaue Beschreibung* der inzwischen in einzelnen Punkten von mir verbesserten Methode zum Schwangerschaftsnachweis, welche die Zahl der zweifelhaften Reaktionen auch in der Hand des Mindergeübten auf ein Minimum herabsetzt, erscheinen.

¹ Diese Zeitschr. 283, 199, 1936. — ² Zentralbl. f. Gynäkol. 58, 1231, 1934. — ³ Ovosi Hetilap. 78, 33, 1934. — ⁴ Boll. della Soc. Piem. di Ostetr. 4, 1934. — ⁵ Med. Klin. 48, 1934. — ⁶ Zentralbl. f. Gynäkol. 39, 2305, 1934. — ⁷ Ronas Ber. 91, 252, 1936.



SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN.

JAHRG. 15

4. JULI 1936

Nr. 27 S. 977

ZUR KENNTNIS DER HISTIDINURIE BEI GRAVIDEN.

Von

REGINE KAPELLER-ADLER und HEINZ HERRMANN.

In der ersten Arbeit über den Mechanismus der Histidinurie bei Graviden konnte die eine von uns gemeinsam mit HAAS¹ zeigen, daß die Leber von graviden Frauen nicht imstande ist, Histidin abzubauen. Es erhob sich nun die Frage nach dem Zustandekommen dieser Erscheinung. Hier lag der Gedanke nahe, als *Arbeitshypothese eine hormonale Beeinflussung der Histidase* anzunehmen. Dies um so mehr, als wir ja wußten, daß die *Histidinurie* gleichzeitig mit der *Umstellung des hormonalen Haushaltes* (Reaktion von ASCHHEIM-ZONDEK) auftritt, und daß andererseits die Histidinausscheidung, wie wir in einer früheren Arbeit zeigen konnten, bei allen von uns untersuchten trächtigen Tieren, welche auch keine positive Aschheim-Zondek-Reaktion gaben, fehlt². Da ähnliche Vermutungen auch von anderer Seite angedeutet wurden, sehen wir uns veranlaßt, unsere bisher gewonnenen Versuchsergebnisse zu veröffentlichen.

Vorläufig beschränken wir uns auf die Mitteilung von Versuchen, die sich mit der *Einwirkung von Prolan auf die Leberhistidase* beschäftigen und denen folgender Ansatz zugrunde liegt:

Die Leber wird im Hofmeisterschen Zerkleinerungsapparat möglichst fein zerkleinert. Hierauf wird m/5 Phosphatpuffer von p_H 8, und zwar 5 ccm auf 1 g Leber, zugesetzt. 5 ccm dieser Leberbreisuspension, entsprechend 1 g Leber, werden in ein Zentrifugenrohr pipettiert. Zu einer Kontrollprobe wird außerdem Universalindicator zugesetzt. Ist durch den Leberbrei eine Verschiebung des p_H eingetreten, so wird die Menge $\frac{1}{10}$ Lauge ermittelt, die zur Wiederherstellung des gewünschten p_H notwendig ist. Diese Laugenmenge wird dann allen Proben zugesetzt. Es wird ferner eine Lösung von Histidinchlorhydrat bereitet, die einer 1proz. Lösung von reinem Histidin entspricht. Davon werden 5 ccm, entsprechend 50 mg reinen Histidins, zugesetzt. Vorher ermittelt man wieder die Menge $\frac{1}{10}$ Lauge, die notwendig ist, um diese 5 ccm Histidinchlorhydratlösung auf ein p_H 8 zu bringen. Diese Laugenmenge setzt man gleichzeitig mit der Histidinlösung den Proben zu. Schließlich fügt man das Prolan (Prolan Bayer in Pulverform in Ampullen zu 500 R.E.*), und zwar 1 Ampulle auf 1 g Leber, zu. Die Proben werden dann mit je 5 Tropfen Toluol versetzt und kommen auf 24 Stunden in den Brutschrank (38°). Dann wird der Leberbrei mit verdünnter

* Für das Entgegenkommen bei der Überlassung größerer Prolanmengen möchten wir der Firma Bayer, Leverkusen, unseren verbindlichsten Dank aussprechen.



Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und die überstehende Flüssigkeit abzentrifugiert. Der Rückstand wird mit Wasser gründlich gewaschen, das Waschwasser abzentrifugiert und die vereinigten Flüssigkeiten auf ein kleines Volumen (etwa 5 ccm) eingengt. Nun wird die Flüssigkeit in einen 20ccm-Meßkolben abfiltriert, der Rückstand mit Wasser gewaschen und zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Je 2 ccm dieser Lösung wurden der colorimetrischen Histidinbestimmung nach KAPELLER-ADLER³ unterworfen. Als Vergleichslösung dienten 2 ccm einer 2,5 pro mill. Histidinlösung⁴.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Versuchsergebnisse, welche wir bei der Untersuchung von 11 Lebern gewonnen haben und welche den Einfluß des Prolans auf den Histidinabbau aufzeigen. Die Lebern sind Sektionsmaterial; sie wurden Stoffwechselgesunden entnommen und zeigten keine pathologischen Veränderungen.

Von 50mg zugesetzten Histidins bauten ab: 1g Leber		Histidinabbau der mit Prolan versetzten Lebern in % der Kontrolllebern
ohne Prolan	mit Prolan	
40,8	38,8	95,1
39,7	30,1	75,8
35,9	14,1	39,3
34,9	18,1	51,8
33,3	24,0	72,1
30,0	21,7	72,0
29,5	10,0	33,9
23,6	14,3	60,6
22,8	16,6	72,8
21,4	10,0	46,7
14,3	8,3	58,0

Die Tabelle zeigt, daß der *Histidinabbau aller Lebern durch Prolan eine Hemmung erfährt*. Der Histidinabbau der mit Prolan versetzten Lebern beträgt 33—95% des Abbaus der Kontrollebern. Es erscheint uns demnach die Annahme in den Bereich der Möglichkeit gerückt, daß das Auftreten der Histidinurie in der Schwangerschaft mit der Ausschüttung des Prolans im Zusammenhang steht.

Versuche über die optimalen Bedingungen der Histidasehemmung durch Prolan, über die Spezifität dieser Hemmung, die quantitative Bearbeitung der Frage und schließlich Versuche an Tierlebern sind im Gange. Erst ihre Fertigstellung wird weitgehende Schlüsse über die hormonale Beeinflussung der Histidase im Zusammenhang mit der Histidinurie von Graviden zulassen. Aus der vorliegenden Mitteilung scheint aber hervorzugehen, daß sich unsere oben angeführten Vermutungen als brauchbare Arbeitshypothese erweisen. (*Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Universität Wien [Vorstand: Prof. Dr. O. v. Fürth].*)

Literatur: ¹ KAPELLER-ADLER u. HAAS, *Biochem. Z.* 280, 232 (1935). — ² KAPELLER-ADLER u. HERRMANN, *Klin. Wschr.* 1934, 1220. — ³ *Biochem. Z.* 264, 131 (1933). — ⁴ Vgl. auch KAPELLER-ADLER u. HAAS, *Biochem. Z.* 280, 234 (1935).

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
 WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
 VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 15

21. NOVEMBER 1936

Nr. 47, S. 1728/1729

**VERBESSERTE METHODIK DER HISTIDIN-
 REAKTION ZUR CHEMISCHEN SCHWANGER-
 SCHAFTSDIAGNOSE.**

Von

REGINE KAPPELLER-ADLER.

Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Universität Wien
 (Vorstand: Prof. Dr. O. v. FÜRTH).

In einer vor etwa 2 Jahren veröffentlichten Arbeit¹ wurde von mir eine einfache chemische Reaktion zur Schwangerschaftsdiagnose empfohlen. Diese Reaktion, welche auf dem Nachweis des von mir im Gravidenharn stets beobachteten Histidins beruht, wurde sehr bald von verschiedenen Untersuchern einer Nachprüfung unterzogen. Die Ergebnisse der seither bekannt gewordenen Arbeiten erwiesen sich keineswegs einheitlich.

Während ALDERS², CHOMET³, STERN⁴, BODO⁵, VALLE⁶, ASITAKA⁷ mittels der obenerwähnten Methode recht gute Resultate erzielen konnten*, fielen die von BRANDSCH⁸ und von HECKSTEDEN⁹ gezeitigten Ergebnisse viel weniger befriedigend aus. Bedeutend schlechtere, mitunter vollkommen unbrauchbare Resultate erhielten OHLIGMACHER¹⁰, LOUROS¹¹, PELLIZZARI¹², BOLAFFI¹³, ROSELLI¹⁴ und GÖCZY¹⁵.

Ferner wäre zu erwähnen, daß M. WEISS¹⁶ die von mir angegebene Methode zum Schwangerschaftsnachweis abänderte; diese Modifikation liefert gänzlich unbrauchbare Resultate. Dies ist dadurch zu erklären, daß WEISS die Grundbedingung für das Gelingen der Histidinreaktion, nämlich das langsame tropfenweise Bromieren des Harns nicht einhält, sondern den Untersuchungsharn mit einem Überschuß einer stärkeren Bromlösung schüttelt. Dadurch entzieht sich zwangsläufig das etwa in geringerer Menge vorhandene Histidin der Untersuchung.

Auch die in Anlehnung an die Arbeit von WEISS veröffentlichte andere Modifikation meiner Methode von FÖLDES¹⁷, die übrigens, wie der Autor selbst hervorhebt, gar keine Histidinreaktion ist, liefert vollkommen unverwertbare Ergebnisse¹⁸.

* Vgl. auch DELLO JOJO GENNARO, Giorn. Clin. med. 17, 232 (1936).



Die vorerwähnte Diskrepanz in den Befunden der einzelnen Nachuntersucher der Histidinreaktion läßt darauf schließen, daß die von den einzelnen Autoren erhaltenen Fehlresultate teils durch die Untersuchungsart, teils durch Mängel der Methode bedingt sind. Trotz ihrer Einfachheit ist nämlich diese Reaktion sehr heikel und erheischt ein sehr sorgfältiges Einhalten der angegebenen Bedingungen sowie eine größere Übung im Beurteilen der Resultate. So führen vor allem viele Autoren eine nicht unerhebliche Anzahl von zweifelhaften Fällen an.

LOUROS, der besonders schlechte Resultate erhalten hat, kämpft mit Schwierigkeiten schon beim Nachweis des Histidins in reinen Lösungen, ein Umstand, der die unbrauchbaren Ergebnisse des Autors bei der Untersuchung von Gravidenharnen ohne weiteres erklärt.

Einen wichtigen Hinweis auf eine Fehlerquelle der Methodik hat KURT STERN geliefert. Der Verfasser konnte beobachten, daß Harne von Patientinnen mit Schwangerschafts-pyelitiden, welche eine positive Griesssche Reaktion auf Nitrite zeigten, größtenteils eine negative Histidinreaktion ergaben. STERN gelang es nachzuweisen, daß es auch tatsächlich Nitrite sind, welche die Histidinreaktion stören, denn durch künstlichen Zusatz einer schwachen Natriumnitritlösung zu einem Gravidenharn, der ursprünglich eine starke Histidinreaktion zeigte, wurde letztere vollkommen gehemmt. Da die Schwangerschafts-pyelitis immerhin keine so seltene Erscheinung darstellt, wobei vielfach mit Griesschem Reagens nachweisbare Nitrite im Harne auftreten, ist der Hinweis auf diese Fehlerquelle von großer Bedeutung.

Die geschilderten Beobachtungen der einzelnen Autoren veranlaßten mich, die von mir angegebene Methode zur Bestimmung des Histidins im Schwangerenharn einer genaueren Überprüfung besonders im Hinblick auf die erwähnten Mängel zu unterziehen. Sehr zahlreiche Versuchsreihen wurden zum Zwecke der Verbesserung der Methode im Bestreben, diese Reaktion auch in der Hand des Mindergeübten sicher zu gestalten, angestellt. Schließlich gelang es, eine Anordnung zu finden, welche, in nitrihaltigen Harnen die Reaktion durch zuführen und jedem einigermaßen chemisch Geschulten die zweifelhaften Fälle fast vollkommen auszuschalten gestattet.

Was zunächst den Histidinnachweis in nitrihaltigen Harnen betrifft, so wurde in vielen mühevollen Versuchen* gefunden, daß nitrihaltige, histidinhaltige Harne nach vorergehender Behandlung mit $\frac{n}{10}$ -Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung die Histidinreaktion sehr schön zeigen. Histidin ist nämlich in der Kälte gegen $\frac{n}{10}$ -Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung vollkommen beständig¹⁹, während die störenden Nitrite durch das Kaliumpermanganat weg-

* Frau Dr. ANITA LUISADA sei für ihre freundliche Beteiligung an den zahlreichen Versuchen auch an dieser Stelle der verbindlichste Dank ausgesprochen.

oxydiert werden. Führt man die *Histidinreaktion in Griess-positiven, histidinhaltigen Harnen mit und ohne Vorbehandlung mit $\frac{1}{10}$ -Kaliumpermanganat* durch, so zeigt *nur der vorbehandelte Harn* eine schöne *Rot-bis Blauviolett-färbung*, während der nicht vorpräparierte Urin intensiv gelbgefärbt erscheint.

Im folgenden sei die neue *Methodik* beschrieben.

Erforderliche Reagenzien. a) *Bromreagens:* 1proz. Auflösung von Brom in 33proz. Essigsäure. Man mißt in einem kleinen Meßzylinder 5 ccm Brom = 15 g Brom ab, bringt sie in einen großen Meßzylinder, fügt 500 ccm Eisessig hinzu und verdünnt mit Wasser auf 1500 ccm. Die Lösung wird am besten in einer braunen Vorratsflasche aufbewahrt.

b) *Ammoniak-Ammoncarbonat-Gemisch:* 2 Teile konz. Ammoniak (Ammonia liquida) werden mit einem Teil einer 10proz. Ammoncarbonatlösung vermischt.

c) *10proz. Schwefelsäure.*

d) $\frac{1}{10}$ *Kaliumpermanganat:* 3,16 g Kaliumpermanganat werden zu 1000 ccm in Wasser gelöst.

e) *Jodkaliumstärkepapier.*

f) *Griessches Reagens* modifiziert nach ILOSWAY, Reagens I: 0,5 g Sulfanilsäure in 150 ccm verdünnter Essigsäure; Reagens II: 0,5 g α -Naphthalimin werden in 20 ccm dest. Wasser gekocht, die Lösung in 150 ccm verdünnter Essigsäure filtriert, I und II werden vereinigt und in dunkler Flasche mit eingeschlifftem Glasstöpsel vor dem Licht geschützt aufbewahrt. Der zu untersuchende Harn wird mit der gleichen Menge des Reagens versetzt, bei Vorhandensein auch nur kleinster Mengen von Nitriten tritt eine Rosa- bis Kirschrotfärbung auf.

Verfahren A. Zur Untersuchung sollen möglichst aliquote Teile eines 24stündigen Mischharnes oder zumindest eines Morgenurins verwendet werden. Der Harn darf nicht sehr diluiert sein, womöglich sollen Urine mit einem spezifischen Gewicht über 1015 zur Untersuchung gelangen. Man bringt in eine 25 ccm-Messprouvette 5 ccm des zu untersuchenden Harnes, setzt *genau* 1 ccm 10proz. Schwefelsäure zu und läßt aus einer *Glashahnbürette* $\frac{1}{10}$ -Kaliumpermanganatlösung *tropfenweise unter fortwährendem Umschütteln* solange zufließen, bis sich *der Harn schwachrosa färbt*. Man läßt die Reaktionsflüssigkeit 2—3 Minuten stehen, während welcher Zeit die Lösung fast farblos oder hellgelb gefärbt wird. Zu dieser Flüssigkeit läßt man nun aus einer *Glashahnbürette mit einer feinen Ausflußspitze* das *Bromreagens* (a) *tropfenweise unter fortwährendem Umschütteln* zufließen, dabei wird auch die evtl. vorher gelb gefärbte Flüssigkeit farblos. Man fährt mit dem *tropfenweisen Bromzusatz* so lange fort, bis die Lösung eine *gelbliche Färbung* angenommen hat. Sodann tüpfelt man auf Jodkalistärkepapier, welches durch *deutliche Bläuung* einen geringen Bromüberschuß anzeigt muß. Läßt die Gelbfärbung nach, so setzt man weitere 1—2 Tropfen Bromreagens zu und tüpfelt wieder auf Jodkalistärkepapier. Die *Reaktion* ist als *beendet* anzusehen, wenn die Lösung nach *10 Minuten Stehen*, noch immer eine *deutliche Bläuung des Jodkalistärkepapieres* hervorgerufen hat. Nun setzt man am besten aus einer kleinen Bürette *genau 1 ccm des Ammoniak-Ammoncarbonatgemisches* (b) hinzu, schüttelt gut durch und bringt die Eprouvete für *genau 40 Sekunden* in ein *Becherglas mit bereits lebhaft kochendem Wasser*. (Letztere Bedingungen sind besonders genau einzuhalten.) In Schwangeren-

harnen erscheint an der Oberfläche ein *intensiver rotvioletter bis blauvioletter Ring*, welcher sich allmählich in der ganzen Flüssigkeit verteilt. Man nimmt hierauf die Eprouvette aus dem kochenden Wasser heraus, schüttelt die Lösung gut durch und bringt sie zum Erkalten für ganz kurze Zeit in ein Becherglas mit kaltem Wasser. Die *Reaktion ist dann als positiv* anzusehen, wenn die Lösung *ganz deutlich rotviolett oder blauviolett* gefärbt erscheint. *Andere Färbungen*, insbesondere solche mit *nur einer Andeutung einer Rosa-farbe*, sind als *negativ* zu werten. *Histidinfreie Harne* bleiben bei dieser Prozedur meist *gelb gefärbt*.

Verfahren B. Bei der Untersuchung *histidinhaltiger Harne*, welche eine *negative Griesssche Reaktion* zeigen, kann man sich auch folgender Methode bedienen. 5 ccm des Mischharnes, welcher zunächst unbedingt mittels des Griessschen Reagens untersucht werden muß, werden in eine 25 cm-Meßeprovette gebracht und *direkt mit dem Bromreagens* aus einer *Glashahnbürette mit feiner Ausflußspitze tropfenweise unter beständigem Umschütteln* versetzt. Der Harn färbt sich zunächst orangerot, dann orangegelb, schließlich citronengelb. Hat die Flüssigkeit diese Farbe erreicht, so wird die Bromierung unterbrochen und es wird auf *Jodkalistärkepapier getüpfelt*, welches *deutlich gebläut* werden soll, wodurch ein leiser Bromüberschuß angezeigt wird. Läßt die Färbung nach, so werden genau, wie unter A beschrieben, 1–2 Tropfen Bromreagens noch zugesetzt und es wird wieder getüpfelt. Nach *10 Minuten Stehen* soll *Jodkalistärkepapier* von der Reaktionsflüssigkeit noch *deutlich gebläut* werden (vgl. o.). Nun werden am besten aus einer kleinen Bürette *genau 0,5 ccm Ammoniak-Ammoncarbonat-reagens* zugesetzt, hierauf wird *gut durchgeschüttelt* und die Eprouvette für *genau 30 Sekunden* in ein Becherglas mit *bereits lebhaft kochendem Wasser* gebracht. Bei Gravidenharnen erscheint an der Flüssigkeitsoberfläche ein *rotvioletter Ring*, von dem rotviolette Schlieren hinunterziehen, bis sich die ganze Flüssigkeit *intensiv rotviolett* färbt. Die *Erwärmungszeit* muß ganz *genau eingehalten* werden. Zum Abkühlen bringt man das Reagensglas in ein Becherglas mit kaltem Wasser. Die *Histidinreaktion* ist, genau wie oben hervorgehoben, bei *nur deutlicher Rot- oder Blauviolett-färbung* als *positiv* zu werten. *Alle anderen Färbungen gelten als negativ*. *Histidinfreie Harne* werden bei dieser Umsetzung in der Regel *gelb bis orangegelb* gefärbt, wobei eine *Andeutung einer schwachen Rosa-färbung als negativ gewertet wird*. Es soll nochmals betont werden, daß *letztere Methode* nur dann verwendet werden kann, wenn man sich vorher durch die *Griesssche Reaktion* überzeugt hat, daß die zu untersuchenden Harne *nitritfrei* sind, also mit dem Griessschen Reagens keine Rotfärbung liefern.

Von jedem Untersuchungsharn sind selbstverständlich Paralleluntersuchungen durchzuführen. Es ist unbedingt notwendig, *frische bzw. mit Chloroform konservierte Harne* der Untersuchung zuzuführen, wobei zu bemerken ist, daß Harne bei längerem Stehen ohne Chloroformzusatz infolge bakterieller Zersetzung häufig nitrit-haltig und daher Griess-positiv werden können.

Zusammenfassend sei nachdrücklichst hervorgehoben, daß die *gegebenen Vorschriften sehr genau eingehalten* werden müssen. In nitrihaltigen, Griess-positiven Harnen kann nur das erste unter A geschilderte Verfahren zur Anwendung gelangen, in nitritfreien Urinen hingegen sowohl das unter A als auch das

unter B beschriebene. Zwecks rascheren Erlernens der Methode empfiehlt es sich, diese einerseits an Harnen Spätgravider, andererseits an solchen sicher Nichtgravider zu erproben.

Was die Wertigkeit dieser verbesserten Methode des Schwangerschaftsnachweises anlangt, so soll folgendes festgestellt werden: Es wurden insgesamt 200 Harnen Nichtgravider* untersucht, wobei 6 Fehlresultate zu verzeichnen waren, was einem Fehler von 3% entspricht. Von 50 Harnen Spätgravider (7. bis 10. Lunarmonat) zeigten 12 eine positive Griess-Reaktion. Diese wurden sämtlich mittels der Methode A aufgearbeitet, wobei kein einziges Fehlresultat erhalten wurde. Die übrigen 38 Urine wurden mittels beider Methoden (A und B) untersucht, wobei nur ein einziges Fehlergebnis zu verzeichnen war, was einem Fehler von 2% gleichkommt. Schließlich gelangten 60 Urine Frühgravider zur Untersuchung. Zwei Harnen von Graviden in der 5. und 6. Graviditätswoche zeigten negative Reaktion, wodurch sich ein Fehler von 3,3% ergibt. Die meisten untersuchten Frühgravididenharnen stammten von Frauen in der 4. bis 10. Graviditätswoche. Drei besonders frühe Fälle zeigten schon eine positive Histidinreaktion, und zwar der Harn einer Frau 10 Tage nach dem Ausbleiben der Menses, weiter der Urin einer Frau 1 Woche nach der ausgebliebenen Menstruation, und schließlich der Harn einer Frau 2 Tage nach der ausgebliebenen Menstruation, wobei es sich nach den präzisen Angaben der Patientin um eine 14 Tage alte Gravidität gehandelt hat. Die Patientin klagte über Schwindel und Kopfschmerzen, während der klinische Befund in diesem Zeitpunkt vollkommen negativ ausfiel. Bei diesen 3 erwähnten Frühfällen konnte kurze Zeit später die Diagnose der Gravidität durch die klinischen Befunde bestätigt werden. Schließlich ist noch zu erwähnen, daß die in einigen der obenerwähnten Fälle parallel durchgeführte Reaktion nach ZONDEK-ASCHHEIM sich vollkommen mit dem Histidinbefund deckte. Bezüglich des kausalen Zusammenhanges zwischen der Zondek-Ashheim-Reaktion und der Histidinreaktion sei übrigens auf eine Arbeit mit HERRMANN²⁰ verwiesen.

Literatur: ¹ Klin. Wschr. 1934, 21. — ² Zbl. Gynäk. 58, 1231 (1934). — ³ Med. Klin. 1934, 48. — ⁴ Zbl. Gynäk. 39, 2305 (1935). — ⁵ Orv. Hetil. (ung.) 78, 33 (1934). — ⁶ Boll. Soc. piemont di Ostetr. 2, 4 (1934). — ⁷ Ronas Ber. 91, 252 (1936). — ⁸ Z. Gynäk. 59, 132 (1935). — ⁹ Dtsch. Z. gerichtl. Med. 24, 253 (1935). — ¹⁰ Klin. Wschr. 1934, 1078. — ¹¹ Klin. Wschr. 1934, 1156. — ¹² Boll. Soc. ital. Biol. sper. 9, 517 (1934). — ¹³ Riv. ital. Ginec. 17, 489 (1935). — ¹⁴ Clin. ostetr. 37, 193 (1935). — ¹⁵ Gyogyaszati (ung.) 75, 131 (1935). — ¹⁶ Klin. Wschr. 1934, 1579. — ¹⁷ Biochem. Z. 283, 199 (1936). — ¹⁸ Vgl. Bemerkungen zu dieser Arbeit, Biochem. Z. 285, 123 u. 296 (1936). — ¹⁹ Biochem. Z. 264, 136 (1933). — ²⁰ KAPPELLER-ADLER u. HERRMANN, Klin. Wschr. 1936, 977.

* Für die Überlassung des zahlreichen Materials bin ich Herrn Dr. JOSEF GÜDEMANN, dem Leiter der Chemischen Laboratorien der Arbeiter-Krankenversicherungskasse Wien, zu großem Danke verpflichtet.

Biochemische Zeitschrift

Begründet von C. Neuberg

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden - Halle a. d. S., M. Ascoli - Palermo, L. Asher - Bern, A. Bach - Moskau,
 G. Barger - Edinburgh, G. Barkan - Dorpat, M. Bergmann - New York, K. Bernhauer - Prag,
 G. Bertrand - Paris, A. Bickel - Berlin, Fr. Boas - München, J. Bodnár - Debreczen, F. Bottazzi -
 Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch - Moskau, T. Chrząszcz - Posen,
 R. Doerr - Basel, A. Durig - Wien, R. Ege - Kopenhagen, H. v. Euler - Stockholm, M. Ferreira
 de Mira - Lissabon, H. Fink - Berlin, J. Forssman - Lund, E. Freund - Wien, O. Fürth - Wien,
 E. Hammarsten - Stockholm, F. Hayduck - Berlin, E. Hägglund - Stockholm, K. Hess - Berlin,
 W. Heubner - Berlin, P. Karrer - Zürich, H. Kautsky - Leipzig, G. Klein - Heidelberg,
 W. Klein - Bonn, A. J. Kluyver - Delft, H. Kraut - Dortmund, R. Krimberg - Riga, P. A. Levene -
 New York, F. Lieben - Wien, K. Lohmann - Heidelberg, H. Lüers - München, Th. Madsen -
 Kopenhagen, E. Mangold - Berlin, L. Marchlewski - Krakau, A. McKenzie - Dundee,
 Kurt H. Meyer - Genf, O. Meyerhof - Heidelberg, L. Michaelis - New York, H. Molisch - Wien,
 K. Myrbäck - Stockholm, W. Nernst - Berlin, K. Noack - Berlin, C. v. Noorden - Wien,
 W. Ostwald - Leipzig, A. Palladin - Charkow, J. K. Parnas - Lemberg, W. Pauli - Wien,
 W. H. Peterson - Madison, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick - Wien, D. N. Prianischnikow -
 Moskau, St. J. von Przylęcki - Warschau, A. Rippel - Göttingen, H. Sachs - Heidelberg,
 T. Sasaki - Tokio, B. Sbarsky - Moskau, A. Scheunert - Leipzig, E. Schmitz - Breslau,
 S. P. L. Sörensen - Kopenhagen, H. Steenbock - Madison, W. Straub - München, U. Suzuki - Tokio,
 H. Theorell - Stockholm, K. Thomas - Leipzig, F. Verzar - Basel, A. I. Virtanen - Helsingfors,
 O. Warburg - Berlin, H. J. Waterman - Delft, E. Widmark - Lund, E. Wöhlich - Würzburg,
 N. Zelinsky - Moskau

herausgegeben von

W. Grassmann
Dresden

Sonderabdruck aus 293. Band, 3.—4. Heft

R. Kapeller-Adler und G. Boxer :

**Über den Einfluß gonadotroper Hormone auf den
Histidinabbau in der Leber**



Berlin
Verlag von Julius Springer

1937



Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt RM 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber:

Herrn Prof. Dr. W. Grassmann, Dresden 24, Wielandstraße 2,

zu richten.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Autoren erhalten eine *Fahnenkorrektur*. Revisionen können nur ausnahmsweise verabfolgt werden und verursachen oft eine Zurückstellung der Mitteilung. Auf Wunsch der in weit entfernten oder überseeischen Ländern wohnenden Mitarbeiter wird die Korrektur ihrer Abhandlung hier gelesen, wodurch ein beschleunigtes Erscheinen ermöglicht wird.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von RM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle RM 30.— für eine Arbeit.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 40 Sonderdrucke unentgeltlich. Weitere 160 Exemplare werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen eine angemessene Entschädigung geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen zum Bogennettopreise berechnet werden. Mit der Lieferung von Dissertationsexemplaren befaßt sich die Verlagsbuchhandlung grundsätzlich nicht; sie stellt jedoch den Doktoranden den Satz zur Verfügung zwecks Anfertigung der Dissertationsexemplare durch die Druckerei.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 22/24.

293. Band

Inhaltsverzeichnis

3.—4. Heft

	Seite
Gebert, Fr. Über die Reaktion zwischen Arsenwasserstoff und Hämoglobin	157
v. Moraczewski, W. und H. Jankowski. Über den Einfluß der Kalksalze auf den Fettgehalt des Blutes	187
Wierzchowski, Zenon. Eine neue Methode zur Bestimmung des Alkaloidgehalts von Lupinen	192
Kapeller-Adler, R. und G. Boxer. Über den Einfluß gonadotroper Hormone auf den Histidinabbau in der Leber	207
Minibek, Harald. Beiträge zur quantitativen fluoreszenz-photometrischen Mikroanalyse. I. Mitteilung: Ein neues Fluoreszenzphotometer zur Messung der durch sichtbares Licht erregten Fluoreszenz (mit Zusatzgerät für ultraviolettes Licht)	219
Barta, L. Die photometrische Bestimmung der Peroxydase und Phenolase	228
Nord, F. F., H. Hofstetter und Else Dammann. Enzymatische Umsetzungen durch <i>Fusarium lini</i> Bolley und <i>Fusarium oxysporum</i> . III. Mitteilung: 15. Mitteilung zum Mechanismus der Enzymwirkung	231
Scheminzky, Fe. und Fr. Die Wirkung des galvanischen Stromes auf Zellgrenzflächen	256
Urban, Fritz F. Über die Verteilung der Phosphatide in normalen und pathologischen Herzen	264

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über den Einfluß gonadotroper Hormone auf den Histidinabbau in der Leber¹.

Von

R. Kapeller-Adler und G. Boxer.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 24. Juli 1937.)

Für die menschliche Gravidität ist die Ausscheidung von Histidin im Harn bezeichnend. *Edlbacher*² konnte zeigen, daß das Histidin hauptsächlich in der Leber durch ein eigenes Ferment, die Histidase, abgebaut werde und daß die Niere das Histidin gar nicht oder nur spurenweise verändere³. In einer Arbeit mit *Haas*⁴ wurde die auffallende Beobachtung gemacht, daß die Leber gravidier Frauen und von Frauen im Puerperium Histidin gar nicht oder nur spurenweise abbaue. Da, wie oben erwähnt, die Niere das Histidin nicht weiter verändert, könnte dadurch die Histidinausscheidung im Harn Gravidier ihre Erklärung finden. Überdies konnte festgestellt werden, daß die Histidinausscheidung im Schwangerenharn vollkommen parallel mit dem Auftreten gonadotroper Hormone im Harn (*Aschheim-Zondek*-Reaktion) verläuft.

Es lag demnach nahe, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Überproduktion von gonadotropen Hormonen und dem Auftreten des Histidins im Harn Gravidier anzunehmen, und es wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, ob nicht die in der Schwangerschaft beobachtete Hemmung der Histidasewirkung durch gonadotrope Hormone bedingt würde. Diese Arbeitshypothese erschien um so verlockender, als es sich zeigte, daß das Wirkungsoptimum der Histidase und des Prolans beim gleichen p_H , nämlich bei 8 liegt⁵. In dieser Richtung mit *Herrmann*⁶ an zehn Lebern unternommene Untersuchungen ergaben, daß die Wirkung der Histidase durch den Zusatz von Prolan „*Bayer*“ (500 RE. für je 1 g Leber) wesentlich gehemmt wird.

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollten zunächst die zur Beleuchtung der Frage nach dem Ursprung des Histidins im Gravidienharn begonnenen Untersuchungen auf eine breitere Basis gesetzt und die bereits gewonnenen Ergebnisse erhärtet werden. Weiter sollte neben Prolan

¹ *Otto v. Fürth* zum 70. Geburtstag. — ² Diese Zeitschr. **224**, 269, 1934. — ³ Vgl. auch *Krebs*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **217**, 218, 1933. — ⁴ *Kapeller-Adler* u. *Haas*, diese Zeitschr. **280**, 232, 1935. — ⁵ *Edlbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **191**, 225, 1930; *Zondek* u. *Euler*, Skand. Arch. Phys. **68**, 232, 1934. — ⁶ *Kapeller-Adler* u. *Herrmann*, Klin. Wochenschr. **15**, 977, 1936.

auch die Wirksamkeit anderer gonadotroper Präparate auf den Histidinabbau untersucht werden.

Die Untersuchungstechnik blieb im großen und ganzen dieselbe, wie wir sie schon in früheren Arbeiten beschrieben haben¹. 100 g Leber wurden durch den *Hofmeisterschen* Zerkleinerungsapparat getrieben und hierauf mit einer Messerspitze Quarzsand verrieben. 20 g dieses Leberbreies wurden genau abgewogen und mit 100 ccm m/5 Phosphatpuffer von p_H 7,65 nach *Sörensen* versetzt und 1 Stunde 30 Minuten in der Schüttelmaschine geschüttelt.

Zwecks Ermittlung des p_H der Leber wurden 4 g des ursprünglichen Leberbreies in 20 ccm Wasser suspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 ccm, entsprechend 1 g Leber, abpipettiert, reichlich mit Wasser versetzt und mittels des Universalindikators jene Menge n/10 Lauge ermittelt, welche nötig ist, um 1 g Leber auf p_H 7,65 zu bringen. Außerdem wird die Menge n/10 Lauge bestimmt, welche notwendig ist, um 5 ccm einer Histidinchlorhydratlösung, welche in bezug auf die freie Histidinbase 1%ig ist, auf p_H 7,65 zu bringen.

Nach dem Schütteln werden von dem in Phosphatpuffer suspendierten Leberbrei 5 ccm, entsprechend 1 g Leber, abpipettiert und nun mit 5 ccm der 1%igen Histidinlösung (entsprechend 50 mg Histidin) und mit der, wie oben beschrieben, sowohl zur Neutralisation der Histidinchlorhydratlösung als auch des Leberbreies notwendigen Menge n/10 Lauge versetzt. Das Prolan wurde in 10 ccm Wasser gelöst und dann erst dem Leberbrei zugesetzt. Die Kontrollebern (ohne Prolan) wurden mit 10 ccm Wasser versetzt. Nuncmehr wurden zu jeder Probe 5 Tropfen Toluol zugefügt und die Ansätze für 21 Stunden in den Brutschrank gebracht. Nach dieser Zeit wurde verdünnte Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion zugefügt, zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit in eine flache Schale gebracht, der Rückstand mit Wasser gründlich gewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls in die Schale gebracht. Nun wird auf dem Wasserbad bis auf ein Volumen von 2 bis 3 ccm eingeengt. Diese Flüssigkeit wird durch ein kleines Faltenfilter in Meßgläser abfiltriert und das Volumen auf 20 ccm gebracht. 2 ccm dieser Lösung werden der kolorimetrischen Histidinuntersuchung nach *Kapeller-Adler*² unterworfen. Als Vergleichsflüssigkeit wird eine Lösung verwendet, welche durch Auffüllen von 5 ccm der 1%igen Histidinlösung auf 20 ccm mit destilliertem Wasser gewonnen wird. Auch von dieser Lösung werden 2 ccm verwendet.

Weiter sei noch besonders hervorgehoben, daß die Wirkung des Prolans und ähnlicher gonadotroper Hormonpräparate auf die Leberhistidase durch Zusatz von größeren Mengen Toluol, weiter von Chloroform und phenolischen Konservierungsmitteln aufgehoben wird.

Es wurden zunächst an 20 Lebern³ von männlichen und weiblichen Personen mit verschiedener Todesursache die Histidasewirksamkeit

¹ *Kapeller-Adler* u. *Haas*, diese Zeitschr. 280, 232, 1935; *Kapeller-Adler* u. *Herrmann*, Klin. Wochenschr. 15, 977, 1936. — ² Diese Zeitschr. 264, 131, 1933. — ³ Für die Überlassung des wertvollen Materials sind wir dem Vorstand des pathologisch-anatomischen Instituts, Herrn Prof. *H. Chiari*, zu großem Dank verpflichtet.

bestimmt und je 1 g dieser Lebern jeweils der Wirkung von Prolan (*Bayer*) ausgesetzt.

In der Tabelle I haben wir die Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Name und Geschlecht	Todesursache	Befund der Leber	Von 50 mg Histidin bauten ab je g Leber			o/10 des Abbaues der Kontrolle
					ohne Prolan (Kontrolle)	mit Prolan		
						RE.		
1	25. V. 1936	R. B., ♂	Tbc. pulm.	parenchym. Deg.	31,5	500	26,5	85
2	2. VI. 1936	O. S., ♂	Perforation der Appendix, Peritonitis	parenchym. Deg.	25,3	500	15,3	60,4
3	4. VI. 1936	S. P., ♂	Apoplexia cerebri	leichte Stauung	23,3	500	8,7	37,4
4	3. XI. 1936	H. B. ♀	Encephalomalacie	Stauung	21,2	500	14,5	68,4
5	22. XII. 1936	O. P., ♂	Suicid. Kopfschuß	o. B.	29,9	500	19,1	63,8
6	19. I. 1937	F. R., ♀	Tumor cerebri	o. B.	19,8	500	13,1	66,1
7	1. II. 1937	S. T., ♀	Ca. ventriculi	Anämie	20,0	500	13,8	68,7
8	8. III. 1937	P. R., ♀	Ca. ventriculi	Anämie	17,4	500	10,8	62,0
9	5. IV. 1937	F. S., ♂	Unfall	o. B.	36,0	100	19,8	55,0
10	12. IV. 1937	O. B., ♀	Ca. oesophagi	o. B.	33,8	100	20,5	60,6
11	15. IV. 1937	R. T., ♀	Suicid	o. B.	30,9	500	25,0	80,9
12	27. IV. 1937	E. W., ♂	Ca. ventriculi	leichte Stauung	17,7	50	8,6	48,7
13	3. V. 1937	W. R., ♀	Encephalomalacie	Stauung	26,4	100	8,1	30,7
14	11. V. 1937	T. K., ♀	Apoplexia cerebri	leichte Stauung	20,7	100	12,4	59,8
15	13. V. 1937	D. F., ♂	Peritonitis	parenchym. Deg.	12,2	100	7,9	64,7
16	20. V. 1937	R. S., ♂	Milzruptur	Anämie	24,7	100	17,0	68,1
17	1. VI. 1937	F. B., ♀	Ca. ventriculi	o. B.	25,9	100	9,3	35,9
18	3. VI. 1937	S. C., ♂	Suicid	o. B.	30,2	100	13,8	45,7
19	7. VI. 1937	L. M., ♀	Urämie	o. B.	34,9	100	17,6	50,4
20	24. VI. 1937	S. B., ♂	Coloncancer	starke braune Atrophie	39,8	100	28,9	72,6
Durchschnitt:					26,1		15,5	59,3

Zwecks Erreichung von Vergleichswerten bei dem so verschiedenen Histidasegehalt der einzelnen Lebern sahen wir uns veranlaßt, die Wirkung des Prolans auf die Histidase auf einen vom absoluten

Histidasegehalt unabhängigen Nenner zu bringen. Wir setzen den Histidinabbau durch 1 g Kontrolleber (ohne Prolanzusatz) = 100 und drücken den Histidinabbau der mit Prolan versetzten Leber in Prozenten des Abbaues der Kontrolle aus.

Die untersuchten Lebern zeigten im allgemeinen keine groben anatomischen Veränderungen, doch dürften auch solche bezüglich der Histidasewirksamkeit keine Rolle spielen, eine Tatsache, auf die wir bereits vorher hingewiesen haben¹. Das Geschlecht hat ebenfalls keinen Einfluß. Weiter geht aus der Tabelle hervor, daß sämtliche untersuchten Lebern durch den Zusatz von Prolan eine Einschränkung der Histidasewirksamkeit erfahren haben.

Zieht man einen groben Durchschnitt durch die Versuchsergebnisse, so zeigt es sich, daß die Lebern von zugesetzten 50 mg Histidin 26,1 mg abbauten, nach Zusatz von Prolan nur mehr 15,5 mg, das stellt 59,3 % des Abbaues der Kontrolleber dar. Die mit *Herrmann* in einer früheren Arbeit durchgeführten Untersuchungen an 10 Lebern ergaben im groben Durchschnitt 58,5 % des Abbaues der Kontrolle, eine Zahl, die mit der eben genannten fast völlig übereinstimmt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit mußten wir uns davon überzeugen, ob neben dem Prolan *Bayer* auch andere Präparate mit gonadotroper Wirkung einen Einfluß auf die Leberhistidase ausüben. Es gelangte das Präparat Prähormon der chemischen Fabrik Promonta² zur Anwendung. Fünf Lebern wurden untersucht; hierbei wurden vollkommen analoge Ergebnisse wie mit Prolan „Bayer“ gefunden.

Tabelle II.

Nr.	Datum 1937	Name und Ge- schlecht	Todesursache	Befund der Leber	Von 50 mg Histidin bauten ab je g Leber			% des Abbaues der Kon- trolle
					ohne Prä- hormon (Kon- trolle)	mit Prähormon		
						RE.		
1	10. III.	O. S., ♂	Apoplexia cerebri	Stauung	34,4	100	25,2	73,2
2	17. III.	R. O., ♂	Gangrän pulmonis	parenchym. Deg.	25,8	100	17,6	68,2
3	5. IV.	F. S., ♂	Unfall	o. B.	36,0	100	13,0	36,1
4	7. IV.	R. T., ♀	Ca. recti	Anämie	33,6	100	20,6	61,2
5	19. IV.	W. K., ♂	Phthisis pulmonis	parenchym. Deg.	15,5	50	8,1	52,2
Durchschn.:					29,1		16,9	58,0

¹ *Kapeller-Adler* u. *Haas*, l. c. — ² Für die freundliche Überlassung zahlreicher Hormonpräparate sei dem Leiter der hiesigen Niederlassung der Firma, Herrn Dr. *L. Pirk*, auch an dieser Stelle herzlichst gedankt.

Die Lebern teils männlicher, teils weiblicher Personen mit verschiedenen Todesursachen bauten von zugesetzten 50 mg Histidin im Durchschnitt 29,1 mg Histidin ab. Nach Zusatz von 100 Ratteneinheiten Prähormon wurden im Durchschnitt bloß 16,9 mg Histidin von zugesetzten 50 mg Histidin abgebaut, was 58 % des Abbaues der Kontrolleleber entspricht.

Ferner stellten wir nach dem Verfahren von Zondek (Alkoholfällungsmethode)¹ aus vier verschiedenen Gravidenharnen die „Prolanfraktion“ dar und ließen diese selbst hergestellten Präparate auf vier verschiedene Lebern einwirken. Es gelangte jeweils etwa $\frac{1}{4}$, in einem Falle nur $\frac{1}{10}$ der aus 1000 ccm Harn einer graviden Frau gewonnenen Prolanfraktion zur Anwendung.

Tabelle III.

Nr.	Datum 1937	Name und Ge- schlecht	Todesursache	Befund der Leber	Von 50 mg Histidin bauten ab je g Leber			% des Abbaues der Kon- trolle
					ohne Prolan- fraktion	mit Prolan- fraktion		
						Teile der Ausbeute		
1	28. IV.	R.W., ♂	Urämie	o. B.	25,0	$\frac{1}{10}$	21,7	87,0
2	11. V.	T.K., ♀	Apoplexia cerebri	leichte Stauung	20,7	$\frac{1}{4}$	10,2	49,2
3	10. VI.	O.K., ♂	Tbc. pulmonis Meningitis tbc.	parenchym. Degeneration	20,0	$\frac{1}{4}$	7,2	36,0
4	17. VI.	K.S., ♂	Fissura baseos cranii	o. B.	11,6	$\frac{1}{4}$	θ	

Die in der Tabelle III zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß die Histidase der Lebern auch in diesem Falle eine deutliche Hemmung erfahren hat. In dem einen Falle wurde die Histidase sogar vollkommen gehemmt. Allerdings war der Histidasegehalt dieser Leber ziemlich niedrig.

Hatten wir bisher durchgehend gonadotrope Hormone des Hypophysenvorderlappens, wie sie im Harn gravidier Frauen ausgeschieden werden, zur Anwendung gebracht, so war es immerhin von Interesse, die Wirkung eines gonadotropen Präparates aus dem Hypophysenvorderlappen selbst zu studieren.

Wir wählten für unsere Versuchszwecke das von „Promonta“ erzeugte „Präphyson“, welches uns von der Firma in dankenswerter Weise in einer von Konservierungsmitteln freien Form zur Verfügung

¹ Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens, S. 236. Wien, Julius Springer, 1935.

gestellt wurde. Es handelt sich hierbei um ein aus dem Hypophysenvorderlappen des Schweines gewonnenes Trockenpulver. Dieses enthält die Gesamtheit der hormonotropen Wirkstoffe der Hypophyse. (Die biologische Standardisierung der Firma ergab in bezug auf das gonadotrope Hormon einen Gehalt von 125 ME. pro g.)

Tabelle IV.

Nr.	Datum	Name und Geschlecht	Todesursache	Befund der Leber	Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber			% des Abbaues der Kontrolle
					ohne Präphyson	mit Präphyson		
						g		
1 a	1. VI.	F. B., ♀	Ca. ventriculi	o. B.	25,9	0,15	26,2	101,0
1 b					25,9	0,3	19,8	76,4
2	7. VI.	L. M., ♀	Urämie	o. B.	34,9	0,5	25,9	74,3

Es wurden aliquote Teile einer Leber einmal mit 0,15 g, das andere Mal mit 0,3 g des Präphysons in Reaktion gebracht (Tabelle IV). Die Histidase wurde durch den Zusatz von 0,15 g Präphyson gar nicht beeinflusst, 0,3 g bewirkten eine deutliche, obzwar keine sehr hohe Hemmung. Zu einer anderen Leber wurden 0,5 g Präphyson zugesetzt. Auch in diesem Falle zeigte sich eine Hemmung der Histidasewirkung. Auf den ersten Blick erscheinen die zur Erzielung einer Wirkung nötigen Präphysonmengen im Vergleich zu Prolan und Prähormon ziemlich hoch. 0,3 g Präphyson würden nämlich bei einem Gehalt von 125 ME. gonadotropen Hormons pro g etwa 40 ME. oder bei einem Verhältnis von ME. zu RE. wie 1:5—8 etwa 200 RE. entsprechen. Dieses Verhältnis gilt nun nach *Zondek*¹, *Hamburger*² und *Lautenschläger*³ nicht für gonadotropes Hormon vom hypophysären Typus. Hier besteht das Verhältnis 1 RE. = 1—2 ME., da in diesem Falle die Mäuse viel empfindlicher sind. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache entsprechen 0,3 g Präphyson etwa 20 RE. und das ist, wie wir später zeigen werden, eben der Grenzwert der Wirksamkeit des gonadotropen Hormons.

Weiter verglichen wir die Wirkung der einzelnen Hormonpräparate wie Prolan, Prähormon, der selbst hergestellten Hormonpräparate und des Präphysons miteinander. Die Unterschiede in der Wirkung (Tabelle V) sind vielleicht auf die teils verschieden, teils überhaupt nicht dosierten Präparate zurückzuführen. Jedenfalls geht aus der

¹ *Zondek*, Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens, S. 231. Julius Springer, 1935. — ² *Hamburger*, C. r. Soc. Biol. Paris 112, 99, 1934. — ³ *Lautenschläger*, Medizin u. Chemie I. G. Farbenindustrie 2, 1934.

Tabelle V.

Nr.	Datum 1937	Name, Geschlecht, Todesursache, Befund der Leber siehe		Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber		o/o des Abbaues der Kontrolle
		Tabelle	Nr.	ohne Zusatz	bei Zusatz des Präparates Dosierung	
1	5. IV.	I	9	36,0	„Prolan“ 100 RE. 19,8	55,0
		II	3		„Prähormon“ 100 RE. . 13,0	
2	11. IV.	I	14	20,7	„Prolan“ 100 RE. 12,4	59,8
		III	2		Eigenes Produkt 10,2	
3	1. VI.	I	17	25,9	„Prolan“ 100 RE. 9,3	35,9
		IV	1		„Präphyson“ 0,3 g. 19,8	
4	7. VI.	I	19	34,9	„Prolan“ 100 RE. 17,6	50,4
		IV	2		„Präphyson“ 0,5 g 25,9	

Tabelle V hervor, daß die einzelnen Präparate an der gleichen Leber verschieden stark wirken können. Da aber die Darstellung der einzelnen Präparate nicht völlig analog ist, lassen sich aus diesen Unterschieden keinerlei Schlüsse ziehen.

Um festzustellen, ob die Größe der Dosis des verwendeten Präparates auf die Hemmung der Histidase einen Einfluß ausübe, stellten wir Versuche mit fallenden Dosen von Prolan und Prähormon an. Die Dosierung nahmen wir so vor, daß wir je nach Bedarf eine oder mehrere Ampullen zu 100 RE. in 10 ccm H₂O lösten und aliquote Teile zur Anwendung brachten. Die sich dabei ergebenden Zahlen decken sich vollkommen bei beiden Präparaten; die Hemmung bleibt bei 500 und 50 RE. die gleiche.

Es gelingt also nicht, durch Anwendung höherer Hormondosen eine stärkere Hemmung der Histidase zu erzielen und den Idealfall, wie er in der Gravidenleber in vivo vorliegen dürfte, in vitro zu erreichen. Zieht man aber die verhältnismäßig groben Versuchsbedingungen, wie sie in vitro vorliegen, in Betracht, so wundert man sich nicht darüber, daß eine vollständige Hemmung der Leberhistidase nicht gelingt. Im Gegenteil ist es überraschend, daß in vitro die Einwirkung eines Hormons auf ein Ferment überhaupt zu beobachten war.

Bringt man noch kleinere Prolandosen zur Anwendung, so nimmt der Einfluß auf die Histidase ab, um bei 20 RE. eine Grenze zu erreichen, jenseits welcher überhaupt keine Wirkung zu erzielen ist. Mit diesem Befund stimmt das oben erwähnte Ergebnis bei Anwendung von 0,15 g Präphyson entsprechend etwa 10 RE., mit welcher Menge keine Einwirkung festgestellt werden konnte, überein.

Zur näheren Betrachtung des Wirkungsmechanismus der eben beschriebenen Präparate stellten wir nach *Edlbachers Vorschrift*¹ eine ge-

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 191, 225, 1930.

reinigte „Histidasefraktion“ dar, indem wir den in Puffersuspension befindlichen Leberbrei zunächst kolierten, dann entweder direkt oder erst nach Zusatz von Kaolin bei 3000 Touren 15 Minuten lang zentrifugierten. Hierbei wurde vergleichshalber immer nur die Hälfte der Lebersuspension gereinigt, die übrige Hälfte wurde wie immer aufgearbeitet. Beide Teile wurden hierauf mit Prolan in Reaktion gebracht.

Die Ergebnisse dieser Versuche (Tabelle VI) sind nicht durchweg einheitlich. In sechs von neun Versuchen war nach dem Abzentrifugieren in dem gereinigten, zellfreien Zentrifugat keine Beeinflussung durch Prolan mehr zu erzielen. Beim Versuch 9 war die Hemmung wesentlich geringer als bei der nicht zentrifugierten Kontrollprobe. Nur bei den Versuchen 6 und 7 blieb die Wirkung des Prolans auch nach dem Zentrifugieren erhalten. Wie diese auffälligen Versuchsergebnisse zu deuten sind, können wir derzeit noch nicht sagen.

Alle bisher angeführten Untersuchungen machen die Annahme sehr wahrscheinlich, daß die Leberhistidase in der Schwangerschaft durch gonadotrope Hormone gehemmt wird und daß weiter dieser histidasehemmende Faktor im Harn gravider Frauen zur Ausscheidung gelangt.

In diesem Zusammenhang erschien uns eine Mitteilung von *Norpoth*¹ von Interesse, in welcher der Autor eine Histidinurie bei verschiedenen Hypophysenvorderlappenveränderungen, bei denen es zu einer Überproduktion gonadotroper Hormone kommt, beobachten konnte. Übrigens konnten wir selbst ebenfalls bei einem Fall von *Cushing*-Syndrom eine Histidinurie beobachten. Biologisch ließ sich in diesem Fall die Ausscheidung gonadotroper Hormone im Harn feststellen. Weiter haben wir bei einer autoptisch sichergestellten Blasenmole, bei der es bekanntlich zu einer Überproduktion an gonadotropen Hormonen kommt, eine Ausscheidung von Histidin im Harn feststellen können.

Um den Beweis zu erbringen, daß die Ausscheidung dieses histidasehemmenden Stoffes nur in der Schwangerschaft erfolgt, wurden bezüglich der Darstellung vollkommen analoge Fraktionen aus Graviden- und Nichtgravidenharn (Harn junger Männer) nach der *Zondek*schen Alkohol-fällungsmethode dargestellt und die erhaltenen Präparate auf ihre Einwirkung auf die Leberhistidase untersucht. Die Resultate (Tabelle VII) im Verein mit den übrigen dieser Arbeit ergeben eindeutig, daß die Substanz, welche das Histidaseferment hemmt, im Harn Nichtgravider nicht ausgeschieden wird.

Da es uns auf Grund unserer Untersuchungen als sehr wahrscheinlich erschien, daß der die Histidase hemmende Faktor im Gravidenharn ausgeschieden wird, wollten wir feststellen, inwieweit die Eigenschaften

¹ Klin. Wochenschr., 16, 1937.

Tabelle VI.

Nr.	Datum	Name, Geschlecht, Todesursache, Leberbefund siehe Tabelle Nr.	Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber							
			ungereinigt			gereinigt				
			ohne Zusatz	mit Zusatz Präparat Dosierung	% des Abbaues der Kontrolle	Art der Reinigung	ohne Zusatz	mit Zusatz Präparat Dosierung	% des Abbaues der Kontrolle	
1	25. V. 1936	I	31,5	Prolan 500 RE.	26,5	Zentrifugiert + Kaolin	23,7	Prolan 500 RE.	23,7	100
2	2. VI. 1936	I	25,3	Dasselbe	15,3	Dasselbe	17,6	Dasselbe	17,6	100
3	4. VI. 1936	I	23,3	"	8,7	Zentrifugiert	13,0	"	13,0	100
4	3. XI. 1936	I	4	"	14,5	"	22,4	"	22,2	100
5	19. I. 1937	I	19,8	"	13,1	"	14,8	"	14,8	100
6	8. III. 1937	I	17,4	"	10,8	Zentrifugiert + Kaolin	21,6	"	14,8	68,5
7	17. III. 1937	II	25,8	Prähormon 100 RE.	17,6	Zentrifugiert	28,0	Prähormon 100 RE.	19,2	68,5
8	3. VI. 1937	I	30,2	Prolan 100 RE.	13,8	Dasselbe	32,7	Prolan 100 RE.	30,5	93,2
9	7. VI. 1937	I	34,9	Dasselbe	17,6	"	34,2	Dasselbe	27,0	78,9

Tabelle VII.

Nr.	Datum	Name, Geschlecht, Todesursache siehe Tabelle Nr.	Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber						
			ohne Zusatz (Kontrolle)			Fraktion aus Normalharn			
			Teil der Ausbeute	% des Abbaues der Kontrolle	Teil der Ausbeute	Teil der Ausbeute	% des Abbaues der Kontrolle	Teil der Ausbeute	% des Abbaues der Kontrolle
1	28. IV. 1937	III	25,0	1/10	25,0	100	1/10	21,7	87
2	11. V. 1937	III	20,7	1/4	20,7	100	1/4	10,2	49,2
3	3. VI. 1937	I	30,2	1/4	30,2	100	—	—	—
4	10. VI. 1937	III	20,0	1/4	20,0	100	1/4	7,2	36,0
5	17. VI. 1937	III	11,6	1/4	11,6	100	1/4	θ	θ

dieses Stoffes mit denen der im Harn zur Ausscheidung gelangenden Hormonen übereinstimmen. Am ehesten erhofften wir uns eine diesbezügliche Aufklärung von solchen Inaktivierungsversuchen, von denen es feststand, daß das gonadotrope Hormon seine biologische Einwirkung auf das Ovar mit Sicherheit einbüßt. Wir stellten uns auf verschiedene Weise, vor allem nach den Angaben von Zondek¹, inaktivierte Prolanpräparate dar.

So kochten wir 100 RE. Prolan 2 und 30 Minuten in neutraler Lösung. Ein anderes Präparat wurde so hergestellt, daß 100 RE. Prolan in etwa 2 ccm Wasser gelöst und in einer flachen Schale bei einer Schichtdicke von etwa 1 mm im Abstand von 10 cm der Einwirkung ultravioletten Lichtes 30 Minuten lang bei konstanter Temperatur ausgesetzt wurden. Ferner haben wir 100 RE. Prolan in 10 ccm 3%igen Wasserstoffsperoxyds, dem 0,1 ccm einer 1%igen Eisenchloridlösung zugesetzt worden waren, 24 Stunden stehengelassen. Nach dieser Zeit wurde durch 3 Tropfen Blut das Wasserstoffsperoxyd entfernt; hierbei zeigte es sich, daß in der Kontrollösung (also prolanfreen Lösung) das Wasserstoffsperoxyd binnen wenigen Minuten gänzlich zerstört war, während in der prolanhaltigen Lösung die Zersetzung etwa 1½ Stunden dauerte. Man könnte dabei an eine Hemmung der Katalase durch Prolan denken. Übrigens sind diesbezügliche Versuche bereits in Angriff genommen worden.

Weiter wurde Prolan in 5 ccm n/10 Schwefelsäure gelöst und 5 Minuten lang gekocht oder 1 Stunde 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Schließlich wurden 100 RE. Prolan in 30 ccm Wasser gelöst und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft.

Alle so gewonnenen inaktivierten Prolanpräparate wurden wie üblich auf die Leberhistidase einwirken gelassen. Es geht aus allen Versuchen (Tabelle VIII) eindeutig hervor, daß es durch die beschriebenen Eingriffe nicht gelingt, den histidasehemmenden Faktor zu zerstören. Es hat also den Anschein, als ob durch die vorerwähnten Versuche wohl die Einwirkung der gonadotropen Hormone auf das Ovar eine Einbuße erführe, nicht aber deren hemmender Einfluß auf die Histidase.

Tabelle VIII.

Nr.	Datum	Name, Geschlecht, Todesursache siehe		Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber					% des Abbaues der Kontrolle (für alle Zusätze gleich)
				ohne Zusatz (Kontrolle)	Zusatz von 100 RE. Prolan normal	100 RE. Prolan inaktiviert durch			
						2 u. 30' Kochen	Bestrahlung	Oxydation	
1	3. V.	I	13	26,4	8,1	8,1	—	—	30,7
2	11. V.	I	14	20,7	12,4		12,4		59,8
3	13. V.	I	15	12,2	7,9			7,9	64,7
4	20. V.	I	16	24,7	17,0	17,0	17,0	17,0	68,1

¹ Hormone des Ovars und des Hypophysenvorderlappens, S. 242. Julius Springer, 1935.

Nr.	Datum 1937	Name, Geschlecht, Todesursache siehe Tabelle Nr.		Von 50 mg Histidin baut ab je 1 g Leber					% des Abbaues der Kontrolle (für alle Zusätze gleich)
				ohne Zusatz (Kon- trolle)	Zusatz von 100 RE. Prolan normal	100 RE. Prolan inaktiviert durch			
						Stehen mit 5 ccm n/10 H ₂ SO ₄	Kochen mit 5 ccm n/10 H ₂ SO ₄	Ein- engen	
1	1. VI.	I	17	26,9	9,3	9,3	9,3	9,3	34,5

In einer Arbeit mit *Herrmann*¹ konnte festgestellt werden, daß die trächtigen Tiere im Harn kein Histidin ausscheiden. Wir hatten Harn von trächtigen Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunden und Stuten untersucht, in keinem Falle konnte aber Histidin nachgewiesen werden. Dieser auffallende Befund stimmte vollkommen mit der Tatsache überein, daß *Zondek* und seine Nachprüfer nachweisen konnten, daß es nur in der menschlichen Gravidität zu einer Überproduktion an gonadotropen Hormonen kommt. Eine Ausnahme bilden die menschenähnlichen Affen und vor allem die Stute. Letztere scheidet in den ersten Zeiten der Gravidität gonadotrope Hormone in großer Menge aus. Leider konnten wir bisher noch keinen Harn einer frühen Gravidität bei der Stute auf Histidin untersuchen.

Es lag nun der Gedanke nahe, nachzusehen, ob die Histidase der Tierlebern ebenfalls durch Prolan *in vitro* gehemmt würde. Die Tabelle IX zeigt unsere Versuchsergebnisse, denen zufolge die Tierleberhistidase ebenfalls durch Prolan hemmbar erscheint.

Tabelle IX.

Nr.	Datum 1937	Tierart	Von 50 mg Histidin baut ab je g Leber			
			ohne Zusatz mg Histidin	mit RE. Prolan	mg Histidin	% des Abbaues der Kontrolle
1	9. VI.	Rind	8,4	100	θ	
2	14. VI.	„	17,7	500	11,8	66,6
3	16. VI.	Kaninchen	39,4	100	25,6	65,0

Da das gravide Tier zum Unterschied von der menschlichen Gravidität keine Überproduktion an gonadotropen Hormonen zeigt — führt ja diese, wie *Zondek* zeigen konnte², beim trächtigen Tier zum Abortus —, kann es auf Grund der Ergebnisse vorliegender Arbeit beim trächtigen Tier auch zu keiner Histidinurie kommen, da ja die hemmende Wirkung des Prolans auf die Leberhistidase hier wegfällt.

Da gezeigt werden konnte, daß die Leberhistidase von Tieren ebenso wie die menschliche durch Prolan hemmbar ist, steht uns nun

¹ *Kapeller-Adler* u. *Herrmann*, *Klin. Wochenschr.* 13, 1220, 1934. —

² *Hormone des Ovars und des Hypophysenvorderlappens*, S. 310.

der Weg des Tierexperiments offen, mittels welchem wir den Mechanismus der Einwirkung gonadotroper Hormone auf die Histidase in vivo zu charakterisieren hoffen. Wir erwarten vor allem, daß es uns glücken wird, bei gleichzeitiger Darreichung von Prolan und Histidin beim Tier eine Ausscheidung von Histidin im Harn zu erzwingen.

Die diesbezüglichen Versuche sind bereits im Gange.

Zusammenfassung.

1. Es wurden 20 Lebern von Personen mit verschiedener Todesursache auf ihre Abbaufähigkeit für Histidin in Gegenwart von gonadotropen Hormonen untersucht. Es konnte in allen Fällen eine starke Einschränkung der Wirksamkeit der Histidase durch diese Hormone festgestellt werden. Vier aus Gravidenharn selbst hergestellte gonadotrope Fraktionen lieferten dieselben Ergebnisse.

2. Ferner konnte festgestellt werden, daß die Wirkung des Prolans auf Histidase im Bereiche von 500 bis 50 RE. völlig von der Dosis unabhängig ist; von 50 RE. an fällt die Wirkung stark ab, um bei 20 RE. einen nicht mehr wirksamen Grenzwert zu erreichen.

3. Durch Zentrifugieren des Leberbreies gewonnene, gereinigte Histidasefraktionen wurden der Wirkung des Prolans ausgesetzt. In sechs von neun Versuchen blieb die hemmende Wirkung des Prolans auf die Histidase aus, in einem Falle war diese stark vermindert, in zwei Fällen übte das Prolan eine Hemmungswirkung aus. Die Deutung dieser Versuchsergebnisse ist bisher noch nicht gelungen.

4. Nach verschiedenen Methoden inaktivierte Prolanfraktionen zeigten in ihrer histidasehemmenden Wirkung keinen Unterschied gegenüber dem aktiven Prolan.

5. Es wurden aus Graviden- und Nichtgravidenharn analoge Fraktionen nach der *Zondek*'schen Alkoholfällungsmethode dargestellt und die gewonnenen Präparate auf Leberhistidase einwirken gelassen. Die aus Nichtgravidenharn stammenden Fraktionen erwiesen sich als völlig unwirksam, während die aus Gravidenharn dargestellten sich vollkommen gleich den käuflichen gonadotropen Hormonpräparaten verhielten.

6. Die Histidase von Tierlebern wird ebenfalls durch Prolan gehemmt. Da aber das trächtige Tier keine Überproduktion an gonadotropen Hormonen aufweist, kann es auch nicht zu einer Hemmung der Leberhistidase in vivo und somit auch nicht zu einer Histidinurie kommen.

<i>Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses:</i>	Seite
Breusch, F. L. Fettresorption und Dialyse von Fettsäuren	280
Schwarz, Carl. Über die Beziehungen der Schilddrüse zum Blutzucker- gehalt und zur Glykogenspeicherung. (Nach Versuchen von A. Bohr und A. Mayer)	295
Harrow, Benjamin, Abraham Mazur, Ernest Borek und Carl P. Sherwin. Studien über Acetylierung. II. Mitteilung: Der Einfluß verschiedener Stoffe auf die Bildung von Paraaminobenzoesäure am Kaninchen	302
Yamafuji, K., S. Goto und N. Iio. Über das Verhalten der Blutkatalase bei der Seiden- raupe unter ungünstigen Lebensumständen	305
Kubowitz, Fritz. Schwermetallprotein und Pyridinprotein, die Komponenten blausäure- und kohlenoxydempfindlicher Alkoholdehydrogenasen	308

Ergebnisse der exakten Naturwissenschaften

Redigiert in Gemeinschaft mit

F. Hund

von

Ferdinand Trendelenburg

Soeben erschienen: Sechzehnter Band

Mit 287 Abbildungen. III, 544 Seiten. 1937. RM 38.—; gebunden RM 39.60

Inhaltsverzeichnis:

Langsame Neutronen. Von Dr. rer. nat. habil. R. Fleischmann und Professor
Dr. W. Bothe, Heidelberg.

Fortschritte der Theorie der Atomkerne. Von Professor Dr. P. Jordan, Rostock.

Messung langer Röntgenwellen mit optischen Gittern. Von Professor Dr. Manne
Siegbahn, Stockholm.

Ferromagnetismus. Von Dr. phil. habil. O. v. Auwers, Berlin-Siemensstadt.

Die Kristallstrukturbestimmung organischer Verbindungen. Von Professor
Dr. H. Mark und Dr. F. Schossberger, Wien.

Nichtstationäre Schallvorgänge. Von Professor Dr. H. Backhaus, Karlsruhe i. B.

Röntgeninterferenzen aus Gitterquellen. Von Professor Dr. W. Kossel, Danzig-
Langfuhr.

The study of surface structure by electron diffraction. Von Professor Dr. G. I. Finch
und Dr. H. Wilman, London.

Das kontinuierliche Spektrum der Sterne. Von Professor Dr. H. Kienle, Göttingen.

Die Theorie des Sterninnern und die Entwicklung der Sterne. Von Professor
Dr. Bengt Strömberg, Chicago.

Inhalt der Bände I—XVI. — Namen- und Sachverzeichnis.

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN

Die chromatographische Adsorptionsmethode

Grundlagen, Methodik, Anwendungen

Von

Dr. L. Zechmeister und Dr. L. v. Cholnoky

Professor Privatdozent
am Chemischen Institut der Universität Pécs (Ungarn)

Mit 45 Abbildungen. XI, 231 Seiten. 1937. RM 14.40

Inhaltsübersicht: **Allgemeiner Teil.** Grundlagen: Anwendungsbereich. — Zur Geschichte. — Die theoretischen Grundlagen der Chromatographie. — Zusammenhang zwischen Chromatogramm und Konstitution. — Methodik: Adsorptionsmittel. — Lösungsmittel. — Elutionsmittel. — Apparatur. — Gang des Versuches. — Flüssiges Chromatogramm. — Adsorption und Elution in wäßriger Lösung. — Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration. — Besondere Methoden zur Chromatographie farbloser Substanzen. — **Spezieller Teil.** Anwendungen auf natürliche Farbstoffe: Chlorophyll. — Porphyrine und verwandte Farbstoffe aus Harn und Kot. — Gallenfarbstoffe. — Carotinoide. — Naphtochinon- und Antrachinonfarbstoffe. — Flavine (Lyochrome). — Pterine. — Anthocyane. — Sonstige natürliche Farbstoffe. — Anwendungen auf künstliche Farbstoffe. — Anwendungen auf farblose und schwach gefärbte Substanzen: Verschiedene aliphatische und hydroaromatische Verbindungen. — Einfachere Benzolderivate. — Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und verwandte Substanzen. — Pflanzliche und tierische Gifte mit sterinartigem Gerüst. — Alkaloide. — Enzyme, Co-enzyme, biochemische Aktivatoren. — Vitamine. — Hormone. — Chromatographie von technischen Gerbstoffextrakten. — Untersuchung von pharmazeutisch verwendbaren Drogen. — Photographische Aufnahmen von Chromatogrammen. — Literatur-, Namen- und Sachverzeichnis.

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN WIEN

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig

Printed in Germany