

Über den Nachweis einiger flüchtiger Amine im Hinblick auf die Untersuchung biologischer Vorgänge

Von

ANTON WACEK und HEINRICH LÖFFLER

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität in Wien

(Mit 2 Tafeln)

(Vorgelegt in der Sitzung am 26. April 1934)

Für manche pathologische Vergiftungserscheinungen macht man die bei gewissen biologischen Prozessen auftretenden Abbauprodukte, die sogenannten Toxine, verantwortlich. Obwohl es in manchen Fällen gelungen ist, solche außerordentlich giftige Produkte zu isolieren — es sei aus den vielen bekannten nur das von BRIEGER entdeckte Neurin herausgegriffen —, wird andererseits, so insbesondere von H. EPPINGER¹, die Meinung vertreten, daß primär sehr flüchtige, eventuell ungesättigte und labile Substanzen recht einfacher Bauart die den Organismus schwer schädigenden Stoffe sind.

Der Nachweis solcher Verbindungen im Organismus ist recht schwierig. Einerseits ist ihre Konzentration in den Organflüssigkeiten (Harn, Plasma usw.) wahrscheinlich in der Zeiteinheit eine sehr geringe, andererseits aber können bei der Aufarbeitung und Konzentrierung diese Substanzen leicht verlorengehen oder sich verändern. Eine Herstellung solcher Stoffe in größerer Menge durch Abbau biologischen Materials *in vitro* bietet wiederum keine Gewähr dafür, daß diese Vorgänge sich außerhalb des Organismus nicht anders abspielen.

Sollte eine Nachweismethode entsprechen, so muß sie folgenden Forderungen nachkommen:

1. Der Nachweis muß womöglich in sehr kleinen Mengen Material und da noch in sehr geringer Konzentration durchführbar sein;
2. Der Nachweis muß es ermöglichen, ähnliche Substanzen

¹ H. EPPINGER, H. KAUNITZ und H. POPPER, Wiener Klin. Wochenschr. 47, 1934, S. 225 u. 262.

nebeneinander und ohne komplizierte Trennungsmethode einwandfrei identifizieren zu können.

Von den flüchtigen Abbauprodukten waren besonders Amine als Endprodukte des Eiweißzerfalles zu erwarten. Von diesen sind ja auch vielfach toxische Wirkungen bekannt. Für den Mikronachweis solcher Amine haben G. KLEIN und M. STEINER² und M. STEINER und H. LÖFFLER³ eine sehr elegante Methode⁴ ausgearbeitet, die der ersten oben aufgestellten Forderung vollaufgenügt. Man kann auf diese Art Aminmengen in der Größenordnung von 1—5 γ nachweisen und auch annähernd quantitativ schätzen, wenn man Vergleichslösungen von bekanntem Amin Gehalt zur Hand hat. Zur Erfüllung der zweiten Forderung haben wir an der Arbeitsweise einige Abänderungen vornehmen müssen, die sich sehr bewährt haben.

KLEIN und STEINER haben bei der Analyse von Pflanzenexhalaten — zur Untersuchung dieses und ähnlichen Materials war die Methode ursprünglich ausgearbeitet worden — stets den Trennungsgang nach FRANÇOIS (Schütteln mit gelbem Quecksilberoxyd in stark alkalischer Lösung), u. zw. in einer für kleine Mengen modifizierten Form in Anwendung gebracht. In diesen Fällen liegen die Verhältnisse insofern günstig, als durch über längere Zeit ausgedehntes Ansammeln eine Anreicherung sämtlicher flüchtiger Stickstoffverbindungen möglich ist. Bei der direkten Untersuchung von Organen und Organteilen von Pflanzen haben STEINER und LÖFFLER wegen der sehr geringen Menge Ausgangsmaterials (einige *mg*) von einer Trennung abgesehen. Das läßt sich bei Pflanzenmaterialien in den allermeisten Fällen wohl durchführen, bei Pilzen aber und ganz besonders bei unseren Versuchen mit tierischen Stoffwechselprodukten (z. B. Harn) ist das Verhältnis Ammoniak zu Aminen ein derart ungünstiges (100 : 1 und darüber), daß eine Abtrennung des Ammoniaks nicht zu umgehen ist, will man nicht Gefahr laufen, daß die durch das Ammoniak und das Reagens im Wassertropfen des Deckglases gebil-

² Jahrb. wiss. Bot. 68, 1928, S. 602.

³ Jahrb. wiss. Bot. 71, 1929, S. 463.

⁴ Die Methode beruht im wesentlichen darauf, daß die Amine aus ihren Salzen am Boden einer Mikrogaskammer (nach Molisch) durch Alkali freigemacht werden. In einem Tropfen Wasser, der an einem Deckgläschen, mit dem die Kammer abgeschlossen ist, hängt, befinden sich einige Kristalle eines Reagens (meist Nitronaphthole), mit dem die Amine charakteristisch kristallisierende Verbindungen ergeben.

deten Kristalle die Reaktionsprodukte aller anderen Amine überdecken. Die immerhin zahlreichen Operationen — Schütteln, Zentrifugieren, Filtrieren, Abdestillieren — der oben erwähnten Abtrennungsmethode sind aber mit ganz kleinen Mengen nicht angereicherten Materials nicht durchführbar.

Abtrennung des Ammoniaks.

Wir versuchten daher die Abtrennung des Ammoniaks auf einfachere Art in der Mikrogaskammer selbst durchzuführen und verfahren dabei folgendermaßen:

Auf den Boden der Gaskammer⁵ kommt ein Tropfen (zirka 0·01 bis 0·03 cm^3) der zu untersuchenden Lösung, die meist neutral oder ganz schwach sauer ist. Man fügt hierauf Quecksilberoxyd zu, bis die gesamte Flüssigkeitsmenge aufgesaugt ist und überschichtet noch mit trockenem Oxyd. Hierauf macht man alkalisch (siehe weiter unten). Als Reagens im Deckglastropfen benützten wir Dinitro-*a*-naphthol. Bei Einhaltung dieser Bedingungen wird Ammoniak, auch wenn es andere vorhandene Amine mengenmäßig übertrifft, quantitativ zurückgehalten. Bei jeder angesetzten Untersuchung wurde ein Präparat ohne Quecksilberoxyd aufgestellt, u. zw. um erstens die Ammoniakmenge annähernd schätzen zu können und zweitens, um in solchen Fällen (Blut, Sputum), wo nur geringe, nicht störende Ammoniakmengen vorhanden sind, ohne Quecksilberoxyd arbeiten zu können.

Fraktionierung in der Gaskammer.

Wir haben nun weiters gefunden, daß man durch stufenweises Erhöhen der Alkalität beim Freimachen der Amine aus ihren Chlorhydraten gleichzeitig eine Fraktionierung erreichen kann, die über die Trennung nur auf Grund der verschiedenen Flüchtigkeit, die schon KLEIN und STEINER angewendet haben, hinausgeht. Modellversuche mit verschiedenen Amingemischen

⁵ Wir verwenden zu diesem Zwecke nicht mehr aufge kittete Ringe, sondern kleine Glasnäpfchen von 15 mm Durchmesser und 15 mm Höhe mit plangeschliffenem Rand, die man eventuell mit einer Spur Vaseline auf dem Objektträger aufklebt. Man erspart so das lästige Aufkitten und ein Undichtwerden des Kitts bei länger dauernden Versuchen und kann nach beendetem Versuch durch Eintragen der Näpfchen in Chromschwefelsäure diese bequem reinigen.

(z. B. Trimethylamin, Dimethylamin, Allylamin, Ammoniak)⁶ zeigten, daß bei Anwesenheit von Quecksilberoxyd aus Proben, die mit Mischung *A*⁷ versetzt wurden, nur das Trimethylamin quantitativ in Freiheit gesetzt wird. Die anderen Amine können nur in Spuren im Deckglastropfen nachgewiesen werden. Über Nacht ist der Tropfen mit dem überschüssigen Reagens und dem Reaktionsprodukt eingetrocknet. Das Deckglas wird entfernt und auf die erste Fraktion untersucht.

Um die anderen Amine erfassen zu können, fügen wir zum Rückstand in der Gaskammer einige Tropfen einer stärkeren Base (meist 2½%ige NaOH) hinzu, wodurch auch diese Reaktionsprodukte im Deckglastropfen erscheinen. Trimethylamin erscheint hier nicht mehr. Sollte in dieser Fraktion doch Trimethylamin auftreten, so deutet dies darauf hin, daß in dem Untersuchungsmaterial ein Stoff vorhanden ist, der bei dieser Behandlung sekundär Trimethylamin abspaltet. Wir haben uns davon überzeugt, daß bei Anwesenheit von nur reinem Trimethylaminchlorhydrat in dieser und in den folgenden Fraktionen kein Trimethylamin mehr aufzufinden ist.

Um nachzuprüfen, ob vielleicht noch geringe Mengen Amine zurückgehalten werden, was bei größeren Aminmengen vorkommen kann, fügen wir schließlich noch einige Tropfen 8%ige Natronlauge hinzu und verfahren ansonsten wie bei den ersten Fraktionen. Bei größeren Ammoniakmengen kann an dieser Stelle schon etwas Ammoniak freigemacht werden. Bei anderen Konzentrationen und Aminmischungen muß man unter Umständen die Laugenkonzentration ändern.

Nachweis einiger noch nicht untersuchter, ungesättigter, flüchtiger Amine.

Nachdem wir aus den eingangs erwähnten Gründen unser Hauptaugenmerk auf ungesättigte Amine richten mußten, so haben wir die von G. KLEIN, M. STEINER und H. LÖFFLER angelegten Tabellen noch in dieser Hinsicht ergänzt und nehmen nur der Vollständigkeit halber in unsere Tabelle auch das einzige von diesen Autoren untersuchte ungesättigte Amin, nämlich Allylamin, auf.

⁶ Für unsere Versuche verwendeten wir 1/10%ige Standardlösungen die im Tropfen (0.03 cm³) ungefähr 30 γ Amin enthalten.

⁷ Mischung *A* besteht aus gleichen Teilen 5%iger Natriumchloridlösung und 5%iger Natriumcarbonatlösung.

Amin	Form	Farbe	Dichroismus	Auslöschung	Interferenz	Schmelzpunkt	
Vinylamin	a) lange gebogene Nadeln in Büscheln	orange-gelb		gerade	Eigenfarbe	132°	Fig. 1
	b) kurze Prismen	rotgelb	stark; hellgoldgelb — dunkelrotgelb				
Allylamin	prismatische Nadeln in Bündeln	stumpfgelb	mittelstark : hellgelb — dunkelgoldgelb	gerade und zirka 18°	mittlere Ordnung — Eigenfarbe	Umlagerung 115° — 145°	Fig. 2
	„ umgelagert	flache prismatische Platten	goldgelb	gerade und zirka 18°	mittlere Ordnung — Eigenfarbe	154°	Fig. 2 a
Propenylamin	a) sechseckige Platten	bräunlich orange	stark; goldgelb — braunorange	gerade	mittlere Ordnung — Eigenfarbe	120°	Fig. 3
	b) kurze Prismen		mittelstark : bräunlichorange — braunorange	zirka 14°			
Diallylamin	kurze, dicke Prismen	braunorange	stark; dunkelgoldgelb — dunkelbraunorange	gerade und zirka 25°	Eigenfarbe	116°	Fig. 4

a) = < ungefähr 30 γ ; b) = > ungefähr 30 γ .

Nachweis eines injizierten toxischen Amins im Blut.

Um uns von der Brauchbarkeit der Methode für unsere speziellen Zwecke zu überzeugen, wollten wir vor allem einmal überprüfen, ob man ein in die Blutbahn eingeführtes Amin nach einiger Zeit im Blute noch nachweisen kann. Wir wählten zu diesem Zweck Diallylamin, das mit Dinitro- α -naphthol sehr charakteristische Kristallformen gibt. Von diesem wurde einem Kaninchen etwas in die Blutbahn injiziert. Von Zeit zu Zeit entnommene Blutproben wurden dann auf das Amin untersucht. Da im Blute sehr wenig Ammoniak vorkommt, konnten wir hier die Abtrennung mit Quecksilberoxyd fortlassen und das Blut direkt untersuchen. Wir konnten in allen Proben das Amin wiederfinden, besonders deutlich in denen, die eine halbe Stunde und unmittelbar vor dem Verenden des Tieres entnommen wurden (Fig. 5).

Zwei Tropfen des zur Untersuchung benötigten Blutes können natürlich jedem Tier ohne irgendeine Schädigung entnommen werden, so daß man dadurch in der Lage ist, einen fortschreitenden Prozeß auch fortlaufend untersuchen zu können. Gegenüber anderen Aufarbeitungsmethoden, bei denen man gezwungen ist, das Tier zu töten, um die Gesamtmenge des Blutes untersuchen zu können, bedeutet dies sicherlich einen Vorteil.

A n w e n d u n g e n d e r M e t h o d e .

Nachdem wir uns jetzt von der Leistungsfähigkeit der oben geschilderten Arbeitsweise ein Bild machen konnten, gingen wir daran, sie in einigen praktischen Fällen anzuwenden. Das Material zu diesen Versuchen wurde uns von der I. Medizinischen Klinik in Wien durch die Herren Prof. Dr. H. EPPINGER und Dr. KAUNITZ zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen wollen.

Wir untersuchten unter anderem mehrere Harnproben und zum Vergleich auch einen normalen Harn. Da im Harn natürlich stets große Mengen Ammoniak vorkommen, mußten wir hier immer unsere Abfangmethode mit Quecksilberoxyd anwenden. Im Normalharn konnten wir so einwandfrei Dimethylamin nachweisen, dessen Vorkommen im Harn unseres Wissens bis jetzt nicht bekannt war. Daneben findet man wenig Trimethylamin. Mit einigen Unterschieden, die wir bei verschiedenen pathologischen Harnen feststellen konnten, wollen wir uns an anderer Stelle befassen, da wir damit beschäftigt sind, unsere Methode diagnostisch auszuwerten. Ein besonders auffälliges Resultat erhielten wir aber bei zwei Harnen, die von Patienten mit schweren Verbrennungen stammten. In diesen war die Trimethylaminmenge ungeheuer gesteigert (Fig. 6, 7, 8). Ähnliche, aber geringere Steigerungen fanden wir auch bei anderen pathologischen Vorgängen, ferner fanden wir Trimethylamin auch in Eiter. Wir glauben daraus schließen zu dürfen, daß dem Trimethylamin als pathologischem Abbauprodukt vielleicht eine größere Bedeutung zukommt, als man bisher angenommen hat. Die Ansicht H. EPPINGERS, daß leicht flüchtige und einfache Körper bei Intoxikationen eine Rolle spielen, würde so eine Stütze finden.

Herrn Direktor PATZAU, durch dessen materielle Unterstützung diese Arbeit wesentlich gefördert wurde, sagen wir unseren besten Dank.

TAFEL I

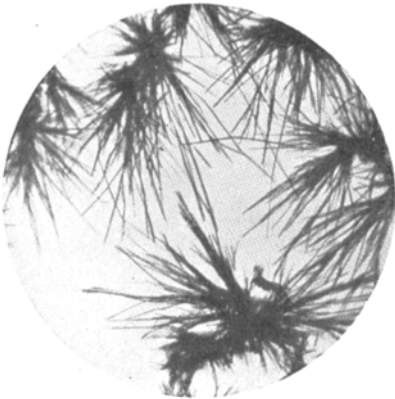


Fig. 1. Vinylamin

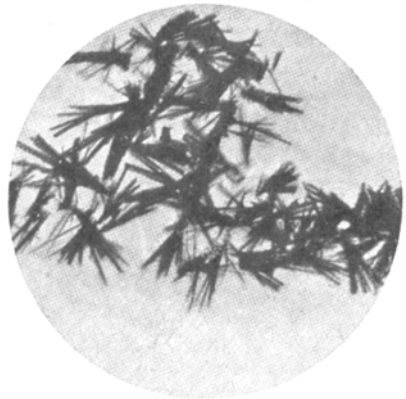


Fig. 2. Allylamin

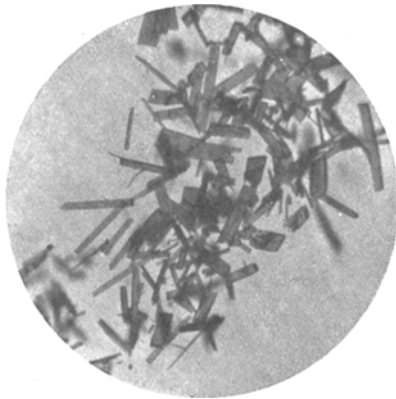


Fig. 2 a. Allylamin „umgelagert“

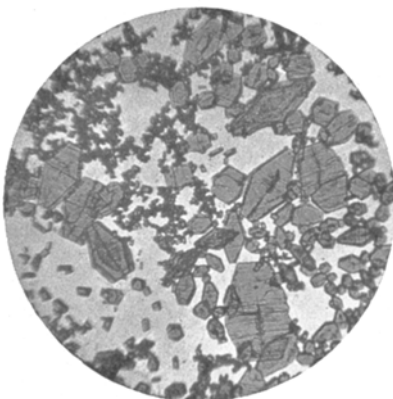


Fig. 3. Propenylamin

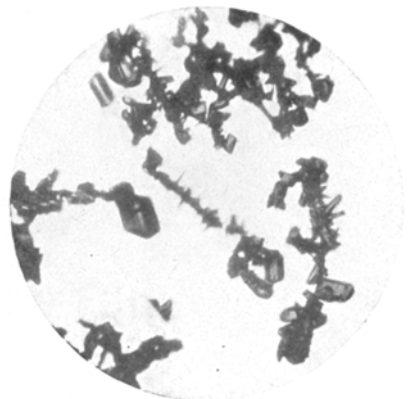


Fig. 4. Diallylamin

TAFEL II

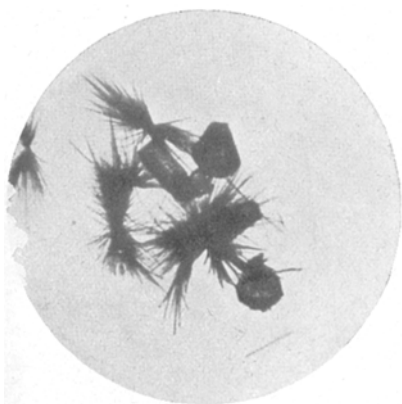


Fig. 5. Diallylamin in Kaninchenblut
(die Büschel sind Ammoniak)



Fig. 6. Trimethylamin in Normalharn



Fig. 7. Trimethylamin im Harn eines
Brandverletzten (hohe Konzentration!)

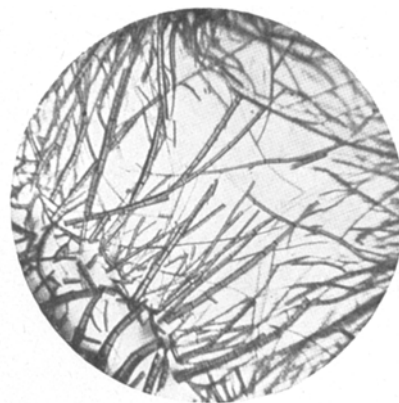


Fig. 8. Das Produkt von Fig. 7 „um-
gelagert“. Charakterist. Querrisse