

Ueber die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen des Harns.

Von Dr. Franz Hofmeister.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium in Prag).
(Der Redaction zugegangen am 24. Dezember 1880).

Zum Nachweis von Pepton habe ich in einer früheren Mittheilung¹⁾ die Fällung des angesäuerten Harnes mit Phosphorwolframsäure empfohlen. Was dabei fällt, ist jedoch nicht blos Pepton, wie schon aus dem Umstande hervorgeht, dass auch der normale völlig peptonfreie Harn von Menschen und Thieren — meine Erfahrungen erstrecken sich auf Harn von Hund, Katze, Kaninchen und Pferd — unter gleichen Verhältnissen mehr oder weniger mächtige Niederschläge liefert; es sind vielmehr an dem Zustandekommen der Fällung wesentlich, in der Regel ausschliesslich, andere Substanzen betheiligt.

Um festzustellen, ob die Anwesenheit der in Rede stehenden Substanzen den Peptonnachweis zu beeinträchtigen vermag, habe ich wiederholt die Niederschläge, die in grösseren Mengen normalen Menschen- und Hundeharns durch Phosphorwolframsäure erzeugt worden waren, auf ihre näheren Bestandtheile untersucht, und wenn ich auch dabei bisher nur auf bereits bekannte Körper gestossen bin, so glaube ich doch mit meinem Befund nicht zurückhalten zu sollen, da er für Nachweis und Darstellung der dabei betheiligten Harnbestandtheile schätzbare Anhaltspunkte bietet.

A. Hundeharn. Grössere Mengen Harnes (nicht unter 10 Liter) von einem mit Fleisch gefütterten Hunde wurden erst mit dem zehnten Theil des Volumens concentrirter Salz-

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. IV. S. 253.

säure, hierauf mit Phosphorwolframsäure so lange versetzt, als noch Niederschlag entstand, die resultirende Fällung mit verdünnter Schwefelsäure (5 Vol. concentrirte Säure auf 100 Vol. Wasser) bis zum Verschwinden der Chlorreaction gewaschen. Sodann wurde der Niederschlag durch Abfiltriren und Abpressen von der anhängenden Schwefelsäure möglichst befreit, mit Barytwasser zu einem dünnen Brei angerührt, zum Kochen erhitzt und durch Zufügung von festem Barythydrat bis zum Vorwalten stark alkalischer Reaction völlig zerlegt. Die von den entstandenen unlöslichen Barytsalzen abfiltrirte Flüssigkeit wurde, wenn dies nöthig erschien, durch Einleiten von Kohlensäure, Aufkochen und Abfiltriren von überschüssigem Baryt befreit, sodann auf ein kleines Volum eingeeengt und noch warm mit Salzsäure bis zu stark saurer Reaction versetzt. Dabei entstand ein dichter, amorpher oder aus feinsten mikroskopischen Nadelchen bestehender, bräunlichgelb gefärbter Niederschlag, welcher auf das Filter gebracht, mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaction gewaschen und hierauf durch Auflösen in Barytwasser in die schwerlösliche, in dreieckigen, glänzenden Plättchen anschliessende Barytverbindung übergeführt wurde. Nach wiederholtem Umkrystallisiren und Entfärben mit Thierkohle wurde dieselbe schliesslich in ungefärbten Nadeln erhalten, deren Eigenschaften und Zusammensetzung ihre Natur als kynurensaurer Baryt ausser Zweifel stellten. Sie verlor über Schwefelsäure getrocknet bei 150° 9,29% an Gewicht und enthielt dann 26,72% Baryum.

Die Formel $C_{20}H_{12}N_2O_6Ba \cdot 3H_2O$ ¹⁾ verlangt 9,52% H_2O und 26,70% Ba.

Die nach dem Ausfällen der Kynurensäure zurückgebliebene stark saure Flüssigkeit wurde neuerdings mit Phosphorwolframsäure versetzt, der erhaltene Niederschlag wie oben ausgewaschen und mit Barythydrat zerlegt. Aus der resultirenden mit Hülfe von Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreiten und stark eingeeengten Flüssigkeit schied

¹⁾ Schmiedeberg und Schultzen. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 164, S. 155.

Chlorzink wenig gefärbtes Kreatininchlorzink ab, das an seiner Krystallform, seiner Schwerlöslichkeit und dem Verhalten gegen Nitroprussidnatrium bei Zusatz verdünnten Alkalis (Weyl's¹) Reaction) erkannt wurde.

Das Filtrat von der Kreatininchlorzinkkrystallisation gab mit Ammoniak übersättigt und mit ammoniakalischer Silberlösung geprüft, weder Fällung noch Trübung. Es waren sonach Xanthinbasen in nachweisbarer Menge nicht vorhanden.

B. Menschenharn. Der direkt mit Salzsäure und Phosphorwolframsäure versetzte Harn lieferte einen röthlich gefärbten Niederschlag, welcher, wie oben für den Hundeharn angegeben, mit Schwefelsäure gewaschen und mit Barythydrat zerlegt wurde. Aus der resultirenden stark eingeeengten Lösung wurde durch Säurezusatz keine Kynurensäure abgeschieden. Dieselbe fehlt dem Menschenharn entweder völlig oder ist darin nur in Spuren vorhanden. In wiederholten, auf diesen Punkt gerichteten Versuchen, bei denen über 20 Liter Harn auf einmal in Arbeit genommen wurden, gab Zusatz von Säure zu der höchst eingeeengten Flüssigkeit keinen Niederschlag, höchstens eine allmählich entstehende schwache Trübung, die sich nach und nach in Form feinsten Tröpfchen am Boden des Gefässes absetzte. Nur einmal wurden mit dem Mikroskop sehr zarte Nadelchen angetroffen, die an Kynurensäure erinnerten, doch handelte es sich dabei stets um verschwindende Mengen. Weitere anzustellende Versuche mit sehr grossen Harnmengen, werden wohl über das etwaige Vorkommen von Kynurensäure im Menschenharn sicheren Aufschluss gewähren.

Dagegen lieferte die durch Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Flüssigkeit nach dem Einengen auf Zufügen von Chlorzinklösung eine sehr reichliche Fällung. In dem Filtrate von dem ausgeschiedenen Kreatininchlorzink konnten durch neuerliches Eindampfen und Chlorzinkzusatz noch wiederholt Krystallisationen erhalten werden. Als keine Ausscheidung mehr erzielt werden konnte, wurde

¹) Th. Weyl, Ber. d. chem. Gesellschaft Bd. 11, S. 2175.

die syrupöse Lösung mit Ammoniak übersättigt und mit ammoniakalischer Silberlösung vollständig ausgefällt. Der erhaltene gallartig flockige Niederschlag wurde mit Ammoniak haltendem Wasser ausgewaschen, dann in wenig heisser Salpetersäure von der Dichtigkeit 1,1 gelöst, worauf sich nach dem Erkalten salpetersaures Xanthinsilberoxyd in Form von aus Prismen bestehenden Drusen abschied. Zu einer Analyse reichte die erhaltene Menge nicht.

Wurde das ammoniakalische Filtrat vom Xanthinsilber, neuerdings mit Salzsäure angesäuert und nach Abfiltriren des ausgeschiedenen Chlorsilbers mit Phosphorwolframsäure versetzt, so erfolgte nur ganz geringe Fällung, aus der weiter einen krystallisirten Körper zu erhalten, nicht gelang.

Im Hundeharn ist sonach Kynurensäure und Kreatinin, im Menschenharn hauptsächlich Kreatinin neben etwas Xanthin an der Bildung des Phosphorwolframsäureniederschlages betheiligt.

Der Umstand, dass die gefundenen Substanzen, Kynurensäure, Kreatinin und Xanthin, mittelst Phosphorwolframsäure aus dem nicht eingeeengten Harn abgeschieden wurden, zeigt deutlich, dass die gefällten Verbindungen in Wasser ausserordentlich schwer löslich sein müssen. Ich habe mich davon für die Kynurensäure und das Kreatinin durch eigene Versuche überzeugt.

Eine Lösung von reinem kynurensauren Baryt, welche 1 Theil Kynurensäure in 4000 Theilen Wasser enthielt, trübte sich sofort auf Zusatz von Salzsäure und Phosphorwolframsäure und liess rasch einen aus rhombischen Täfelchen bestehenden Niederschlag fallen. Bei einer Verdünnung von 1 : 12000 trat auf Zusatz der genannten Reagentien zunächst nur schwache Trübung ein, allein nach 24 Stunden hatten sich auch hier Kryställchen abgesetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde übrigens selbst in Lösungen, die nur $\frac{1}{16,000}$ Kynurensäure enthielten, Krystallabscheidung beobachtet.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure empfiehlt sich sonach zur Abscheidung der Kynurensäure aus ihren Lösungen.

Sie ist in dieser Richtung dem gewöhnlich geübten Verfahren, Abscheidung der freien Säure aus ihren Salzen durch Zufügung von Salzsäure oder Essigsäure vorzuziehen, einmal weil sich die Verbindung mit Phosphorwolframsäure aus noch verdünnteren Lösungen ausscheidet als die freie Kynurensäure, andererseits, und dies ist das wesentlichere Moment, weil die Kynurensäure in einem Ueberschuss von Säure wieder in Lösung geht und daher die Gefahr nahe liegt, bei Anwendung von Säure eine ungenügende Ausbeute zu erhalten.

Bei der Gewinnung der Kynurensäure aus Hundeharn mit Hülfe von Phosphorwolframsäure verfare ich in der oben beschriebenen Weise. Es ist zweckmässig den zur Verarbeitung bestimmten Harn durch Säurezusatz vor Fäulniss zu schützen; wenigstens lieferte mir fauler Harn auffällig geringe Ausbeute. Zum Ansäuern des Harns habe ich mich stets der Salzsäure bedient, doch sind hierzu auch andere Mineralsäuren verwendbar. Anwendung von Essigsäure hingegen ist zu vermeiden, da Kynurensäure aus mit Essigsäure übersättigter Lösung überhaupt nicht durch Phosphorwolframsäure gefällt wird. Behufs Reinigung der durch Zerlegen des Barytsalzes mit Säure erhaltenen unreinen Kynurensäure empfiehlt es sich dieselbe in ammoniakhaltigem Wasser zu lösen und der Flüssigkeit tropfenweise Bleizuckerlösung bis zur Bildung eines mässig starken Niederschlages zuzufügen. Das weingelbe Filtrat liefert auf Säurezusatz wenig gelb gefärbte Kynurensäure, die durch Ueberführen in das Barytsalz, Entfärben desselben mit Thierkohle und wiederholtes Umkrystallisiren unter Zusatz von Ammoniak weiter gereinigt wird.

Aelteren Angaben zufolge kann der zur Darstellung der Kynurensäure bestimmte Harn vorher mit Bleizuckerlösung gefällt werden; dies scheint mir jedoch nicht räthlich, da kynurensaurer Baryt mit Bleisalzen wie mit den Salzen der meisten schweren Metalle unlösliche Niederschläge¹⁾ gibt.

¹⁾ Der Niederschlag ist bei Anwendung von essigsaurem Bleioxyd und Zinkchlorid weiss und im Ueberschuss des Fällungsmittels löslich. Kupferacetat gibt gelbgrüne, Eisenchlorid ziegelrothe, Platinchlorid hellgelbe, salpetersaures Silberoxyd und Quecksilberoxyd. weisse Fällung.

Dass die Kynurensäure mit der Phosphorwolframsäure, einem Reagens, das zum Nachweis organischer Basen benutzt wird, unlösliche Verbindungen eingeht, mag auf den ersten Blick befremdlich erscheinen, ist jedoch verständlich im Hinblick auf die Beobachtung Kretschy's¹⁾, wonach sie ein Derivat des Chinolins ist.

Die Fällbarkeit des Kreatinins durch Phosphorwolframsäure ist bereits von Kerner²⁾ bemerkt worden, doch hat dieser Autor die Empfindlichkeit dieser Reaktion zu niedrig geschätzt. Seine Angabe, dass Kreatinin schon bei einer Verdünnung von 1:1000 der Fällung entgeht, ist offenbar nicht zutreffend; es wäre sonst unverständlich, dass ich mit Hilfe des genannten Reagens aus nicht eingengtem, normalem Menschenharn, welcher nicht über 1 p. M. Kreatinin enthält, reichliche Mengen dieses Körpers gewinnen konnte.

Thatsächlich gibt eine Lösung von 1 Theil Kreatinin in 100 Theilen Wasser auf Zusatz von Salzsäure und Phosphorwolframsäure nach kurzem Umschütteln einen aus feinen Nadeln bestehenden Niederschlag und auch eine Lösung von 1:3000 setzt nach einigem Stehen Kryställchen ab. Um in verdünnteren Lösungen Niederschläge zu erzielen, bedarf es eines Ueberschusses von Chlorwasserstoff und Phosphorwolframsäure, und die Abscheidung der Kryställchen erfolgt nur allmählich, allein sie tritt in 24 Stunden selbst bei einer Verdünnung von 1:12000 in unzweifelhafter Weise ein. Die Phosphorwolframsäure steht sonach an Empfindlichkeit der von Kerner in dieser Richtung geprüften Phosphormolybdänsäure nicht nach, nur muss die Probe längere Zeit im Auge behalten werden³⁾.

Bei der Gewinnung des Kreatinins wird man diesem Umstande durch längeres Stehenlassen des mit Phosphorwolframsäure versetzten Harnes Rechnung tragen. Statt Salz-

¹⁾ Kretschy, Berichte d. chem. Gesellschaft, Bd. 12, S. 1672.

²⁾ Kerner, Archiv f. d. ges. Physiologie v. Pflüger, Bd. 2, 226.

³⁾ Das zum Fällen des Kreatinins empfohlene Quecksilberchlorid steht als Reagens der Phosphorwolframsäure an Empfindlichkeit weit nach; es lässt schon bei Verdünnungen von 1:2000 im Stich.

säure kann zum Ansäuern auch eine andere Mineralsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure, nicht aber Essigsäure Verwendung finden. Aus einer mit Essigsäure übersättigten concentrirten Kreatininlösung fällt Phosphorwolframsäure das Kreatinin nur sehr allmählich und unvollständig, aus einer halbwegs verdünnten aber gar nicht.

Kreatin verhält sich in verdünnter mit Salzsäure versetzten Lösung gegen Phosphorwolframsäure völlig indifferent, aus concentrirter Lösung setzt sich auf Zusatz des genannten Reagens bei längerem Stehen ein grob krystallinischer Niederschlag ab.

Die Fällbarkeit des Xanthins durch Phosphorwolframsäure entspricht dem Verhalten dieser Base gegen Phosphormolybdänsäure, das bereits von Seiten Kerner's Beachtung gefunden hat.

Zum Schluss sei in Betreff des Peptonnachweises im Menschenharn hervorgehoben, dass das Kreatinin, der einzige Körper, welcher in beträchtlicher Menge in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingeht, die Anstellung der Biuretprobe nicht behindert. Eine Lösung von Kreatinin nimmt mit Natronlauge und etwas Kupfersulfat versetzt eine blaue Farbe an, die jedoch schon auf Zusatz höchst geringer Mengen Pepton der charakteristischen Rosa- oder Violettfärbung Platz macht. Eine Gefahr für den Peptonnachweis droht nur von Seite des im normalen Harn vorkommenden mucinähnlichen Eiweisskörpers, der jedoch in so geringen Mengen vorhanden ist, dass ich bei Untersuchung der Phosphorwolframsäureniederschläge weder ihm noch etwaigen peptonähnlichen Zersetzungsprodukten desselben begegnet bin.

Aber noch in anderer Richtung ist das Mitgetheilte für den Nachweis von Pepton von Interesse. Wie erwähnt wird Kreatinin (wie auch Kynurensäure) nach Ansäuern mit Essigsäure durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt. Pepton gibt aber unter diesen Verhältnissen noch in grosser Verdünnung Trübung oder Niederschlag. Dieser Umstand lässt sich für die Prüfung von Harn auf Pepton in folgender Weise dienstbar machen. Man fällt den zu prüfenden Harn behufs Entfernung

der im Harn in Spuren vorhandenen Eiweissstoffe mit unzureichenden Mengen Bleizuckerlösung¹⁾ und versetzt das Filtrat, das völlig klar sein muss und mit Essigsäure und Ferrocyankalium keine Trübung geben darf, mit ungefähr dem fünften Theile des Volumens concentrirter Essigsäure und fügt nun eine mit Essigsäure angesäuerte Lösung von phosphorwolframsaurem Natron hinzu. Sofort oder in den ersten 5 Minuten eintretende milchige Trübung deutet auf die Anwesenheit von Pepton hin. Dieselbe tritt schon auf, wenn der Peptongehalt etwas über 0,01% beträgt. Ist kein Pepton vorhanden, so bleibt der Harn, wie ich mich an zahlreichen von Gesunden und Kranken herrührenden Proben überzeugen konnte, stundenlang, meistens tagelang völlig klar. Natürlich ist das Ausfallen der Reaction in positivem Sinne noch kein genügender Beweis, dass wirklich Pepton vorliegt und muss dies erst durch nähere Untersuchung erhärtet werden. Dennoch dürfte dieselbe als vorläufige Probe für die rasche Orientirung von Nutzen sein.

¹⁾ Vergl. diese Zeitschrift, Bd. 4, S. 262.