

Zur Kenntniss der schwefelhaltigen Verbindungen des Harns.

Von

E. Goldmann und **E. Baumann.**

(Der Redaction zugegangen am 14. Januar 1888.)

Die Frage, ob der normale Harn Cystin oder diesem ähnliche Körper enthalte, ist öfters behandelt und neuerdings von Stadthagen¹⁾ einer eingehenden Prüfung unterzogen worden, welche zu dem Ergebniss geführt hat, dass derartige Stoffe im normalen Harn gar nicht oder in äusserst minimalen Mengen vorkommen.

Stadthagen benützte die Zersetzung des Cystins beim Kochen mit Bleilösung und Alkali, zerlegte das hierbei gebildete Schwefelblei mit Salzsäure und bestimmte die Menge des entbundenen Schwefelwasserstoffs durch Einleiten in eine Silberlösung. Bei 12 Versuchen erhielt Stadthagen aus einem Liter Harn im Mittel nur 0,3 Milligramm Schwefel, welcher beim Kochen des Harns mit Bleilösung und Kalilauge in Bleisulfid übergeführt worden war.

Die Arbeit Stadthagen's schien durch die sorgfältige Ausführung der Versuche und Beobachtungen die aufgeworfene Frage endgiltig zu entscheiden, und wir hätten nicht daran gedacht, dieselbe von Neuem zu bearbeiten, wenn nicht eine gelegentliche Beobachtung uns eine directe Veranlassung dazu geboten hätte.

Wenn man eine Lösung von Cystin in Natronlauge mit einigen Tropfen Benzoylchlorid schüttelt, so entsteht in dem

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 131 ff.

Maasse, als das Benzoylchlorid verschwindet, ein sehr voluminöser Niederschlag von seidenglänzenden Blättchen eines Natriumsalzes des Benzoylcystins $C_6H_{10}N_2S_2O_4(C_7H_5O)_2$. Dieses Salz ist schwer in kaltem, leichter in heissem Wasser löslich; in überschüssiger Natronlauge ist es fast unlöslich.

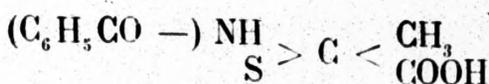
Wenn man zu der verdünnten Lösung dieses Salzes eine stärkere Säure hinzufügt, so erstarrt die Flüssigkeit meist zu einer durchscheinenden Gallerte, aus welcher beim Erwärmen oder beim Stehen die freie Säure allmählig in dichteren Flocken abgeschieden wird, so dass man dieselbe abfiltriren kann.

Das Benzoylcystin ist eine starke Säure, in Wasser so gut wie unlöslich; in reinem Aether löst sie sich wenig, leichter in alkoholhaltigem Aether und noch leichter in Alkohol. Aus der alkoholischen Lösung krystallisirt es in feinen Nadeln, welche zu blumenkohlartigen Massen vereinigt sind. Es schmilzt bei $156-158^\circ$. Beim Kochen mit starker Salzsäure wird es in Benzoesäure und Cystin allmählig gespalten.

Die Analyse der trockenen Substanz ergab Werthe, welche der Formel des Benzoylcystins entsprechen.

	Berechnet		Gefunden:
	für $C_{20}H_{20}S_2N_2O_6$:		
C_{20}	= 240	53,57 %	53,4 %
H_{20}	= 20	4,46 „	4,74 „
S_2	= 64	14,28 „	— „
N_2	= 28	6,25 „	6,05 „
O_6	= 96	21,43 „	— „
	448	99,99.	

Wenn das Cystin, wie es in hohem Grade wahrscheinlich ist, das Disulfid der α -Amidothiomilchsäure ($CH_3 - C \begin{matrix} NH_2 \\ SH \end{matrix} - COOH$) darstellt, so kommt dem Benzoylcystin die folgende Formel zu:



Die Ausbeute an Benzoylcystin ist eine sehr gute; aus 1 gr. reinem Cystin wurden beim Schütteln der verdünnten alkalischen Lösung mit 10 ccm. Benzoylchlorid 1,7 gr. Benzoylcystin erhalten, während die Theorie 1,86 gr. erwarten lässt.

Beim Kochen mit Alkalien wird das Benzoylcystin, unter Abspaltung von Schwefel, zersetzt wie das Cystin. Zur Beendigung dieser Zersetzung ist indessen mehrstündiges Erwärmen auf 100° erforderlich.

Der Umstand, dass das Benzoylcystin aus wässrigen Flüssigkeiten leicht durch Aether aufgenommen und dadurch von den übrigen Harnbestandtheilen getrennt werden kann, liess diesen Körper für den Nachweis kleiner Mengen von Cystin im Harn besonders geeignet erscheinen.

Zunächst wurde ein Vorversuch gemacht, bei dem 10 Milligramm Benzoylcystin zu 100 ccm. frischen Urines zugesetzt wurden. Nach starkem Ansäuern wurde die Flüssigkeit mit gewöhnlichem Aether wiederholt ausgeschüttelt. Der nach dem Abdestilliren des Aethers erhaltene Rückstand wurde in Natronlauge aufgenommen, mit Bleilösung versetzt und gekocht, dabei bildete sich nach kurzer Zeit ein allmählich sich vermehrender Niederschlag von Schwefelblei. Bei einem zweiten Versuche wurden 0,010 gr. Cystin, in einigen Tropfen verdünnter Natronlauge gelöst, zu 100 ccm. frischen Harnes hinzugesetzt und letzterer in folgender Weise weiter behandelt: Der Harn wurde mit 10 ccm. Benzoylchlorid und 70 ccm. Natronlauge von 1,12 spec. Gew. so lange geschüttelt, bis der Geruch des Benzoylchlorids verschwunden war. Die vom Niederschlage (Benzoylverbindungen der Kohlehydrate des Harns nebst geringen Mengen von Phosphaten) abfiltrirte alkalische Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit (alkoholhaltigem) Aether ausgeschüttelt. Der nach Abdestilliren des Aethers gewonnene Rückstand, welcher hauptsächlich aus Benzoesäure bestand, aber auch das gebildete Benzoylcystin enthielt, wurde mit Natronlauge und einigen Tropfen Bleiacetat einige Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Das hierbei gebildete Schwefelblei wurde mit Wasser, verdünnter Essigsäure und schliesslich mit Alkohol

ausgewaschen; sein Gewicht betrug 0,0135 gr. PbS entspr. 0,00655 gr. Cystin.

Als normaler Harn in gleicher Weise mit Benzoylchlorid und Natronlauge behandelt und weiter verarbeitet wurde, lieferte der Aetherextract ausnahmslos Niederschläge von Schwefelblei, dessen Menge allerdings sehr wechselt, aber doch wesentlich mehr beträgt, als Stadthagen bei seinen Versuchen im Mittel gefunden hat. So lieferte beispielsweise ein normaler Harn aus 200 ccm. 0,0025 gr. Schwefelblei. In der Regel genügen 200 ccm. Harn für diesen Nachweis. Mitunter ist die Menge des erzielten Schwefelbleis erheblich geringer als in dem angeführten Beispiele, bisweilen aber erhält man auch grössere Mengen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass jedenfalls nicht die ganze Menge des Cystins oder des cystinähnlichen Körpers zum Nachweis gelangt. Eine genaue quantitative Bestimmung dieses Körpers ist mit der vorliegenden Methode — vorläufig wenigstens — nicht ausführbar. Der qualitative Nachweis — wenn auch geringer Mengen — von Cystin oder einem ähnlichen Körper im Harn ist aber immerhin von einer principiellen Wichtigkeit.

Bei der wiederholten Prüfung des normalen Harns musste es des Oefteren auffallen, dass bei der von uns befolgten Untersuchungsmethode durchschnittlich mehr Schwefelblei aus dem Harn gewonnen wurde, als Stadthagen erhalten hatte, obschon dieselbe nur einen Theil des vorhandenen Cystins nachweisen liess.

Eine Erklärung dieses Umstandes ergab sich aus der genaueren Untersuchung des Verhaltens von Cystin gegen alkalische Bleilösung. Man glaubte bisher allgemein, dass das Cystin seinen Schwefel beim Erhitzen mit Alkalien leicht und vollständig abgebe. Nur das Erstere ist richtig: schon beim schwachen Erwärmen von Cystin mit Bleioxyd und Natronlauge tritt bekanntlich die Abscheidung von Schwefelblei ein; filtrirt man nach einiger Zeit vom Schwefelblei ab und kocht die gelbgefärbte Lösung von Neuem, so entsteht wieder Schwefelblei, und diesen Versuch kann man noch oftmals wiederholen. Um in den quantitativen Verlauf dieser

Abspaltung einen Einblick zu gewinnen, wurden 0,387 gr. reines Cystin mit 100 ccm. reiner Natronlauge von 1,12 spec. Gew. und 10 ccm. Bleiacetatlösung in einem Kolben im siedenden Wasserbade erhitzt. Nach wenigen Minuten hatte sich ein reichlicher Niederschlag von Schwefelblei gebildet. Nach 2stündigem Erwärmen wurde das gebildete Schwefelblei abfiltrirt, getrocknet und gewogen. Seine Menge betrug 0,310 gr. Das Filtrat gab bei weiterem Erwärmen bald wieder einen Niederschlag von Schwefelblei, dessen Gewicht nach 3 Stunden 0,142 gr. ausmachte. Das Filtrat dieses Niederschlags trübte sich bei weiterem Kochen erst nach einiger Zeit, lieferte aber nach 4stündigem Erhitzen wieder eine Quantität von 0,0725 gr. Schwefelblei. Das fast farblose Filtrat dieses Niederschlages blieb beim Kochen über freiem Feuer längere Zeit klar, erst nach einer Viertelstunde stellte sich wieder eine geringe Trübung und schliesslich ein kleiner Niederschlag von Schwefelblei ein. Das Filtrat dieser Abscheidung gab nach dem Eindampfen und Erhitzen mit Salpeter eine sehr bemerkbare Schwefelsäurereaction.

Nach 9stündigem Erhitzen mit alkalischer Bleilösung hatten also 0,387 gr. Cystin nicht mehr als in Summa 0,5245 gr. Schwefelblei geliefert, während eine glatte und vollkommene Abspaltung des Schwefels 0,767 gr. Schwefelblei hätte liefern müssen.

Die langsame Abspaltung des Schwefels war uns zuerst beim Kochen des Benzoylcystins mit alkalischer Bleilösung aufgefallen; der quantitative Verlauf kann hier natürlich kein wesentlich anderer sein als beim Cystin selbst, und hieraus ist die Differenz der Beobachtungen von Stadthagen und von uns nicht zu erklären. Der Grund derselben ergibt sich vielmehr aus dem Umstande, dass eine Lösung von Cystin im Harn noch wesentlich langsamer und unvollkommener seinen Schwefel beim Kochen mit Alkali abgibt, als eine reine Cystinlösung.

In 700 ccm. frischem Harn wurden unter Zusatz einer geringen Menge Salzsäure 0,5 gr. Cystin gelöst; 200 ccm. dieses Harns, welche also 0,143 gr. Cystin enthielten, wurden

mit 200 ccm. Natronlauge und etwas Bleilösung 5 Stunden lang auf 100° erwärmt; nach 5 Stunden wurde der Niederschlag abfiltrirt, mit dem Filter in einen Kolben gebracht, in letzterem durch verdünnte Salzsäure zerlegt, der entwickelte Schwefelwasserstoff wurde unter Erwärmen und Durchleiten von Kohlensäure vollständig in eine mit Essigsäure stark angesäuerte Bleilösung geleitet; das so gewonnene Schwefelblei wurde auf getrocknetem Filter gesammelt, mit Wasser und zuletzt mit Alkohol gewaschen, getrocknet¹⁾ und gewogen. Seine Menge betrug 0,103 gr. Die völlige Abspaltung des Schwefels hätte 0,2837 gr. Schwefelblei liefern müssen. Ein zweiter Versuch, bei welchem 200 ccm. Harn mit 0,141 gr. Cystin mit 200 ccm. concentrirter Natronlauge und etwas Bleilösung 8 Stunden lang auf 100° erwärmt wurden, lieferte nach derselben Methode 0,090 gr. Schwefelblei, während bei völliger Abspaltung des Schwefels 0,277 gr. Schwefelblei zu erwarten waren.

Wir haben uns durch einen Controlversuch vergewissert, dass die von uns benützte Zersetzung des aus dem Harn abgeschiedenen Schwefelbleis durch Salzsäure und Uebertreiben des entwickelten Schwefelwasserstoffs in eine vorgelegte Bleilösung keine oder keinen, irgend in Betracht zu ziehenden Verlust an Schwefel bedingt. 0,095 gr. Schwefelblei, welches durch Zersetzung von Benzoylcystin mit alkalischer Bleilösung gewonnen war, wurden in derselben Weise und mit dem gleichen Apparate, welcher zu den vorher beschriebenen Versuchen benützt worden war, mit verdünnter Salzsäure in der Wärme zerlegt; der entwickelte Schwefelwasserstoff wurde in eine Bleilösung geleitet und der wieder erzeugte Niederschlag von Schwefelblei auf getrocknetem Filter gesammelt und gewogen; seine Menge betrug 0,0941 gr. Schwefelblei.

1) Das Trocknen wurde nie länger als 20 bis 30 Minuten fortgesetzt, um Oxydationen des Schwefelbleis zu vermeiden. Controlwägungen zeigten indessen, dass diese Gefahr unter den vorliegenden Verhältnissen gar nicht in Betracht kommt.

Aus dem Mitgetheilten geht hervor:

1. Im normalen Harn sind geringe Mengen von Cystin oder einem dem Cystin sehr ähnlichen Körper enthalten.
2. Durch Kochen einer alkalischen Lösung von Cystin wird der Schwefel des Cystins langsam und unvollkommen abgespalten.
3. Diese Zersetzung des Cystins ist noch weniger vollständig, wenn cystinhaltiger Harn mit alkalischer Bleilösung erhitzt wird.

Ueber die Quantitäten des Cystins im normalen Harn haben wir keine genaueren Angaben gemacht, weil die Methode zur quantitativen Bestimmung desselben nicht verlässlich genug erscheint. Immerhin können dieselben nicht so bedeutend sein, dass sie einen erheblichen Theil der nicht in Form von Schwefelsäure vorhandenen Schwefelverbindungen ausmachen. In diesem Punkte werden also die Schlussfolgerungen Stadthagen's durch unsere Versuche kaum alterirt.

Im Hundeharn kann man gleichfalls mit der Benzoylchloridreaction das Vorhandensein von Cystin oder cystinähnlichen Körpern nachweisen. Hierbei ist aber erforderlich, dass der zu untersuchende Harn vor der Behandlung mit Natronlauge und Benzoylchlorid von der unterschwefligen Säure befreit wird — durch Stehenlassen oder Verdunsten des angesäuerten Harns und Filtriren. Wir haben uns überzeugt, dass bei der Phosphorvergiftung beim Hunde die Ausscheidung der genannten schwefelhaltigen Substanz erheblich gesteigert wird; 100 ccm. Harn des mit Phosphor vergifteten Thieres lieferten bei der Benzoylchloridbehandlung 0,011 gr. Schwefelblei, während 100 ccm. des normalen Hundeharns nur 0,002 gr. Schwefelblei ergaben.

Die Widersprüche in den Angaben über die Abspaltung des Schwefels aus dem Cystin legten den Gedanken nahe, dass es verschiedene vielleicht isomere Cystine gäbe, welche in dieser Hinsicht sich ungleich verhielten. Es standen uns Cystinproben von 3 verschiedenen Provenienzen zu Gebote:

die qualitative Prüfung derselben ergab indessen, dass dieselben beim Kochen mit alkalischer Bleilösung sich ganz gleich, wie oben beschrieben wurde, verhielten.

Wir haben auch nicht unterlassen, von demselben Cystin, welches bei unseren Versuchen verwendet wurde, durch die Analyse die Reinheit des Präparates zu controliren:

0,203 gr. desselben gaben bei der Schwefelbestimmung 0,3915 gr. BaSO_4
= 26,49 % Schwefel.

0,2425 gr. Substanz gaben 0,2695 gr. CO_2 = 30,31 % Kohlenstoff und
0,1142 gr. H_2O = 5,18 % Wasserstoff.

0,212 gr. Substanz lieferten 21,5 chem. Stickstoff bei 17° und 751 mm.
Druck = 11,63 %.

Aus der Vergleichung dieser Werthe mit den von der Formel des Cystin geforderten erhellt, dass reines Cystin vorlag.

	Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$:	Gefunden:
C	30,00 %	30,31 %
H	5,00 »	5,18 »
N	11,66 »	11,63 »
S	26,66 »	26,49 »

Dass die Schwefelabspaltung aus dem Cystin bei der Einwirkung von Alkalien langsamer erfolgt, als die Mercaptanbildung aus den dem Cystin nahe verwandten Mercaptursäuren, hat der Eine von uns schon früher¹⁾ beobachtet. Die Thatsache, dass das Cystin in dieser Hinsicht eine noch viel weitergehende Verschiedenheit von den Mercaptursäuren zeigt, als bisher bekannt war, findet eine, wie es scheint, einfache Erklärung in dem Umstande, dass in dem Cystin ein Theil des Schwefels durch secundäre Reactionen in die feste Bindung mit 2 Kohlenstoffatomen eintreten kann. Behandelt man Brenztraubensäure, welcher ein Körnchen Chlorzink zugesetzt ist, mit Schwefelwasserstoff und erhitzt das Reactionproduct mit alkalischer Bleilösung, so wird auch hier ein Theil des gebundenen Schwefels alsbald, ein anderer Theil sehr allmählig abgespalten, so dass man stundenlang erhitzen muss, bis die allmählig geringer werdende Abscheidung von Schwefelblei ganz aufhört.

1) Baumann, Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 15, S. 1734.