

Zur Bestimmung des Cystins im Harn.

Von

Dr. med. **Peter Borissow** (aus Petersburg).

(Aus dem Laboratorium von Professor **Baumann** in Freiburg i. B.)
(Der Redaction zugegangen am 5. Mai 1894.)

Vor einiger Zeit hat **Brenzinger**¹⁾ gezeigt, dass das salzsaure Cystein mit Quecksilberchlorid in wässriger Lösung eine fast ganz unlösliche krystallinische Verbindung gibt, in welcher 3 Mol. Quecksilberchlorid mit 2 Mol. Cystein unter Abspaltung freier Salzsäure zusammengetreten sind. **Brenzinger** schreibt dieser Verbindung die Formel $2(C_3H_7NSO_2) + 3HgCl_2$ zu, bemerkt aber, dass sie beim Auswaschen mit Wasser Salzsäure und Quecksilberchlorid verliere, wesshalb die Analyse keine gut stimmenden Werthe geliefert hat. Beim Trocknen im Vacuum und über Schwefelsäure wird gleichfalls Salzsäure (7—8%) abgegeben.

Die geringe Löslichkeit dieser Substanz in Wasser und der Umstand, dass sie aus schwach salzsaurer Lösung ebenso vollständig als aus der säurefreien Lösung ausgefällt wird, sprachen dafür, dass sie für die Abscheidung des im Cystinharn gelösten Cystins verwerthet werden könne, wofür eine

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 557.

hinreichend genaue Methode bis jetzt nicht existirt¹⁾). Auf Vorschlag von Herrn Prof. Baumann habe ich es unternommen, diese Frage einer Prüfung zu unterziehen.

Zunächst war es von Wichtigkeit, zu ermitteln, ob grössere Mengen von Salzsäure und von Salzen die Ausfällung der Quecksilberverbindung des Cystöins beeinträchtigen. Brenzinger²⁾ hat aus 2,4 gr. Cystin, welchen er zuvor durch Behandlung mit Zinn in salzsaurer Lösung in Cystin überführte, 9,6 gr. der Quecksilberverbindung erhalten, während nach der Theorie 9,8 gr. gebildet wurden.

I. Versuch. 0,088 gr. Cystin wurden in 20 cbem. verdünnter Salzsäure (1:10) gelöst und mit Zinnfolie auf dem Wasserbade behandelt. Die abfiltrirte Lösung wurde auf 100 cbem. verdünnt, mit Schwefelwasserstoff behandelt und nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch einen Kohlensäurestrom wieder filtrirt. Das Filtrat wurde mit Quecksilberchloridlösung versetzt. Der weisse krystallinische Niederschlag wurde nach 24 Stunden abfiltrirt und über Schwefelsäure getrocknet. Sein Gewicht betrug 0,1845 gr., entspr. 0,0486 gr. Cystin, oder 55,2% der wirklich vorhandenen Menge.

Um die Wirkung der grösseren Menge freier Salzsäure, welche im ersten Versuch die völlige Abscheidung der Quecksilberverbindung verhinderte, auszuschliessen, wurde beim folgenden Versuch weniger Salzsäure und zur Reduction Zink genommen, ausserdem Natriumacetat zu der Flüssigkeit hinzugefügt.

II. Versuch. 0,202 gr. Cystin wurden in 15 cbem. verdünnter Salzsäure gelöst. Die Lösung wurde mit 50 cbem. Wasser vermischt und mit Zink behandelt. Die vom Zink abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit 1,5 gr. Quecksilberchlorid und 7 gr. Natriumacetat in gesättigten Lösungen versetzt. Das Gewicht des Niederschlages betrug nach dem Trocknen über Schwefelsäure 0,4285 gr. Nach 24 Stunden hatte sich aus dem Filtrat ein weiterer Niederschlag, welcher 0,0995 gr. wog, abgeschieden. Wir erhielten also im Ganzen 0,5280 gr. der

¹⁾ Vergl. B. Mester diese Zeitschrift, Bd. 14, S. 109.

²⁾ L. c.

Quecksilberverbindung des Cystins. 0,528 gr. dieser Verbindung entsprechen 0,15 gr. Cystin, oder 70,7% der wirklich vorhandenen Menge.

Beim folgenden Versuche wurde die Reduction auf dem Wasserbade ausgeführt und die Lösung bis auf ein kleines Volumen verdunstet.

III. Versuch. 0,2015 gr. Cystin wurden in 10 cbcm. verdünnter Salzsäure gelöst, mit 50 cbcm. Wasser vermischt und mit Zink auf dem Wasserbade behandelt. Das Filtrat vom Zink nebst Waschwasser wurden auf dem Wasserbade bis zu 30—40 cbcm. verdunstet. Nach dem Erkalten wurde diese Flüssigkeit mit 1,5 gr. Quecksilberchlorid in gesättigter Lösung vermischt, hierbei entstand ein erster Niederschlag, welcher nach 24tägigem Trocknen über Schwefelsäure 0,4002 gr. wog. Zu dem Filtrate des Niederschlags wurden 5 gr. Natriumacetat (in gesättigter Lösung) hinzugesetzt, worauf ein zweiter Niederschlag entstand, welcher nach dem Trocknen 0,3395 gr. wog. Als zum Filtrat noch Quecksilberchlorid hinzugesetzt wurde, entstand beim Stehen ein dritter Niederschlag von 0,094 gr. Also erhielten wir $0,4002 + 0,3395 + 0,094 = 0,8337$ gr., was nach Brenzinger 0,1896 gr. Cystin oder 94,1% der wirklich vorhandenen Menge entspricht.

Da Brenzinger fand, dass die Quecksilberverbindung beim Trocknen über Schwefelsäure in 39 St. zwischen 7—8% an Gewicht verliert, so war anzunehmen, dass beim letzten Versuch alles Cystin in dem Niederschlag enthalten war. Um uns davon zu überzeugen, wurde noch eine Schwefelbestimmung nach Carius' Methode ausgeführt.

0,2100 gr. der erhaltenen Quecksilberverbindung gaben 0,1024 BaSO_4 , was 6,76% S in der Substanz entspricht. Brenzinger fand 6,62%. Berechnen wir nach diesem Procentgehalt an Schwefel, wie viel Cystin wir bekommen haben, so resultiren 0,2044 gr. Wir haben also zuviel und zwar um 0,003 gr. gefunden; diese Differenz kann durch einen kleinen Fehler der Schwefelbestimmung oder durch die Unbeständigkeit der Verbindung bedingt sein, wofür auch folgende Erfahrung spricht.

Als wir nach 7 Tagen noch einmal Schwefelbestimmungen derselben Substanz machten, wurden noch etwas höhere Werthe gefunden:

1. 0,2010 gr. Substanz gaben 0,1055 Ba SO₄, was 7,03 % Schwefel entspricht.
2. 0,2015 gr. Substanz gaben 0,1079 Ba SO₄ = 7,35 % Schwefel.

Um uns von den erhaltenen Resultaten besser zu überzeugen, haben wir noch einen Versuch gemacht.

IV. Versuch. 0,2005 gr. Cystin wurden in 10 cem. verdünnter Salzsäure gelöst und nach Zusatz von 50 cem. Wasser mit Zink auf dem Wasserbade behandelt. Nach der Filtration wurde die Flüssigkeit etwas eingedampft und nach dem Erkalten mit 2 gr. Quecksilberchlorid und 8 gr. Natriumacetat in gesättigten Lösungen versetzt, wodurch ein Niederschlag entstand. Am folgenden Tage wurde dieser Niederschlag abfiltrirt, mit Wasser gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet, bis keine Veränderung des Gewichts mehr stattfand. Das Gewicht der Substanz nach 2 tägigem Trocknen betrug 0,774 gr. und verringerte sich bei längerem Stehen im Exsiccator bis auf 0,768 gr. Eine Schwefelbestimmung ergab aus 0,1560 gr. Substanz 0,079 gr. Ba SO₄, was 6,96 % Schwefel entspricht.

Bei Berechnung auf Grund der Schwefelbestimmung haben wir somit 0,20046 gr. Cystin wieder gefunden, während 0,2005 gr. Cystin in Arbeit genommen. Wir ersehen daraus, dass man auf dem geschilderten Wege eine Bestimmung des Cystins in wässriger Lösung ganz ohne Fehler machen kann.

Was die Zusammensetzung der Quecksilberverbindung anlangt, so haben wir im Mittel aus drei Bestimmungen gut getrockneter Substanz für den Schwefel 7,11 % und nicht 6,06 %, wie der Formel von Brenzinger entsprechen würde, gefunden. Das hängt, wie Brenzinger selbst bemerkt, und wie es auch aus seiner Analyse hervorgeht, von dem Verlust der Substanz an Salzsäure ab. Um Fehler zu vermeiden, ist es deshalb erforderlich, nicht nur das Gewicht der Quecksilberverbindung, sondern auch ihren Schwefelgehalt zu be-

stimmen und letzteren für die Berechnung des im Niederschlag enthaltenen Cystins zu verwerthen.

Da die Verbindung des Cystöins mit Quecksilberchlorid unbeständig ist und sich beim Trocknen immer verändert, so muss man bei Berechnung der Menge des Cystins auf Grund der Zahlen der Quecksilbersteinverbindung eine gut über Schwefelsäure getrocknete Substanz haben; von dieser Verbindung entsprechen dann nach unseren Bestimmungen 0,767 gr. annähernd = 0,2 gr. Cystin (nach Brenzinger = 0,192 gr. Cystin). Um die Brauchbarkeit der Methode für die Cystinbestimmung im Harn zu prüfen, stand mir ein natürlicher Cystinharn, welcher in den letzten Jahren im hiesigen Laboratorium oft untersucht worden ist (Mester l. c.), zur Verfügung.

Bei der Untersuchung des Harns sind wir auf grosse Schwierigkeiten gestossen. Erstens war es schwer, das Cystin vollständig in den Niederschlag zu bringen und zweitens enthielt der Quecksilberchloridniederschlag immer noch andere Bestandtheile, von welchen das Cystin bzw. das Cystöin schwer getrennt werden konnte.

Zu jedem Versuche wurden 500 ccm. Cystinharn verwendet, welcher mit 20 ccm. verdünnter Salzsäure und Zink auf dem Wasserbade behandelt wurde.

Nach dem Filtriren vom Zink wurden die Flüssigkeiten mit Quecksilberchlorid und Natriumacetat in concentrirten Lösungen vermischt und stehen gelassen.

Da sich zeigte, dass die Abscheidung der Quecksilberverbindung des Cystöins im Harn durch die Gegenwart einer grösseren Menge von Natriumacetat begünstigt wird, wurden bei 3 Versuchen steigende Mengen von Natriumacetat verwendet.

1. Versuch: 10 gr. HgCl_2 und 8 gr. Natriumacetat.
2. Versuch: 10 gr. HgCl_2 und 10 gr. Natriumacetat.
3. Versuch: 10 gr. HgCl_2 und 20 gr. Natriumacetat.

Die abfiltrirten Niederschläge und die Filtrate wurden mit Schwefelwasserstoff behandelt und vom Quecksilbersulfid abfiltrirt. Die Flüssigkeiten wurden nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs mit Kohlensäure bis auf kleine gleiche Volumina

auf dem Wasserbade verdunstet und durch Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge geprüft. Die Resultate waren beinahe gleich, sowohl die Filtrate, als die Niederschläge der Quecksilberverbindungen enthielten Schwefel. Dabei ist zu bemerken, dass bei den beiden letzten Versuchen, bei welchen grössere Mengen von Natriumacetat verwendet wurden und der Harn zuvor eingedampft war, das Cystin zum grösseren Theil in den Niederschlag übergegangen war. Bei diesen Versuchen ergab sich also, dass immer noch erhebliche Mengen von Cystin in Lösung geblieben waren. Die völlige Abscheidung des Cystins aus der Flüssigkeit gelang erst, als das vom Quecksilberchlorid befreite Filtrat vom ersten Versuche bis auf ein kleines Volumen verdunstet, mit Zink und Salzsäure aufs Neue behandelt und mit 10 gr. Quecksilberchlorid und 10 gr. Natriumacetat versetzt wurde. Die vom Niederschlag abfiltrirte Flüssigkeit wurde von Quecksilberchlorid befreit und bis auf ein sehr kleines Volumen verdunstet. Die ganze Flüssigkeit gab jetzt beim Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge nur Spuren von Schwefelblei.

Dieser Versuch zeigte uns, dass man das Cystin vollständig in den Niederschlag bringen kann. Dabei ist es aber sehr störend, dass bei der Fällung in essigsaurer Lösung auch andere Harnbestandtheile durch das Quecksilberchlorid, unter anderen auch Harnstoff, mitgefällt worden. Es liegt nun die neue Aufgabe vor, aus diesen Fällungen das reine Cystin zu bekommen, was mit grossen Schwierigkeiten verknüpft ist.

Von den vielen Versuchen, welche ich zu diesem Zwecke angestellt habe, will ich nur diejenigen hier schildern, welche zwar zu keinem durchaus befriedigenden Erfolg, aber doch zur Gewinnung von nahezu reinem Cystin geführt haben. Die vereinigten Quecksilberniederschläge wurden mit Schwefelwasserstoff unter Wasser zersetzt, aus dem Filtrat wurde der Schwefelwasserstoff durch Kohlensäure entfernt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zum Trocknen verdunstet. Der trockene Rückstand wurde mit Alkohol absolutus zerrieben. Nach einigen Stunden oder am folgenden Tage wurde die alkoholische Flüssigkeit abfiltrirt und der Rückstand noch einigemal mit Alkohol extrahirt. Wenn der Rückstand gut

getrocknet und wasserfreier Alkohol angewendet wird, so kann man in der alkoholischen Lösung mit Bleiacetat und Natronlauge nicht mehr als Spuren von Cystin nachweisen. Der nach der Behandlung mit Alkohol gebliebene Rückstand wurde in wenig Ammoniak gelöst, filtrirt, mit dem 10fachen Volumen Weingeist (96 %) vermischt und alsbald von dem entstandenen Niederschlag abgegossen und filtrirt. Der Rückstand wird aufs Neue mit wenig Ammoniak und mit viel Weingeist behandelt. Die vereinigten Filtrate wurden eingedampft, der Rückstand in sehr wenig Ammoniak gelöst, mit der 10fachen Menge Spiritus versetzt und bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Nach dem Verdunsten des Ammoniaks entsteht ein Niederschlag, welcher nach der Schwefelbestimmung 75 % Cystin und 25 % andere Substanzen aufweist. Die Abscheidung des Cystins ist aber keine völlige.

Durch wiederholtes Eindampfen der Flüssigkeit kann man noch ein wenig Cystin bekommen; ein Theil des Cystins aber bleibt immer in der Lösung.

Von der Anwesenheit des Cystins überzeugten wir uns auf Grund der Reaction mit Bleiacetat und Natronlauge.

Die Menge des Cystins in den Niederschlägen beurtheilten wir auf Grund der Schwefelbestimmungen nach der Methode von Carius.

Als wir in der beschriebenen Weise 500 ccm. Harn verarbeiteten, erhielten wir 0,3343 gr. unreines Cystin.

Die Schwefelbestimmung wurde mit 0,154 gr. ausgeführt, welche 0,2224 gr. BaSO_4 lieferten, entsprechend 0,1145 gr. Cystin. Daraus berechnet sich für die in Arbeit genommene Menge Harn (500 ccm.) ein Gehalt von 0,2485 gr. Cystin und für die Tagesmenge (2000 ccm.) von 0,994 gr. Cystin.

Der Procentgehalt des im Harn gelösten Cystins betrug danach fast genau 0,05 %.

Diese Zahl steht im Einklang mit den Zahlen, welche Mester¹⁾ über die Löslichkeit des Cystins im Harn angibt. Dass der von uns untersuchte Harn immer eine gesättigte

¹⁾ Beiträge zur Kenntniss der Cystinurie 1887, Diss.

Cystinlösung darstellte, ergibt sich aus dem Umstand, dass in dem Harn immer einzelne Cystinkrystalle sich abschieden, wenn der Harn kurze Zeit stehen blieb. Diese Zahl, ca. 1 gr. pro Tag, steht auch im Einklang mit den Werthen, welche Me^ster bei unserem Cystinpatienten früher auf indirectem Wege durch Bestimmung des oxydirten und des nichtoxydirten Schwefels gefunden hat. Wenn es somit auch gelungen ist, annähernd das Cystin aus dem Harn abzuschneiden, so muss doch besonders bemerkt werden, dass das so gewonnene Cystin immer noch verunreinigt war.

Nach dem Verdunsten des Ammoniaks aus der ammoniakalischen Lösung des Cystins entsteht ein schwerer krystallinischer Niederschlag, worin man nur wenige 6seitige Tafeln des gut krystallisirten Cystins erkennen kann. Die Mehrzahl der Krystalle stellt an einander gereihte kugelförmige Gebilde dar, welche immer gelb gefärbt sind.

Bessere Resultate kann man erhalten, wenn der Niederschlag aus der ammoniakalischen Lösung in Salzsäure gelöst, die Flüssigkeit filtrirt und bis zum Trocknen eingedampft wurde, der Rückstand des salzsauren Cystins in Wasser gelöst, mit Natriumacetat versetzt und auf dem Wasserbade langsam verdunstet wurde, dann krystallisirte das Cystin ziemlich gut; obgleich wir sagen müssen, dass auch hierbei nur ein Theil des Cystins krystallisirt, der andere aber in Lösung bleibt.

Wir verkennen nicht, dass auch durch das im Vorstehenden geschilderte Verfahren die Frage der Bestimmung des Cystins im Harn nicht in befriedigender Weise gelöst wird, glauben aber, dass dasselbe, bis eine bessere Methode gefunden wird, sich für gewisse Fälle als brauchbar erweisen wird. Vielleicht ist es noch der Verbesserung fähig.

Einen Theil des im Harn gelösten Cystins gelingt es auch, auf einem einfachen Wege abzuschneiden: Der möglichst weit eingedampfte Harn wird mit ammoniakhaltigem Weingeist 2 Mal extrahirt, dabei geht das Cystin so gut wie völlig in die weingeistige Lösung. Versetzt man letztere mit dem 3—4 fachen Volum Aether, so entsteht eine syrupdicke Abscheidung, in welcher ein erheblicher Theil des Cystins sich findet. Dieses

wird, nachdem die Alkohol- und Aether-Mischung abgossen ist, in Ammoniak gelöst. Beim Verdunsten der ammoniakalischen Lösung wird Cystin (wieder in undeutlich ausgebildeten Krystallen) abgeschieden. Dieses Verfahren lässt aber nur einen Theil des im Harn enthaltenen Cystins gewinnen und eignet sich nicht als quantitative Methode.

Nachdem Baumann und v. Udránszky¹⁾ bei Cystinurie die Diamine in Harn und Fäces gefunden haben und dieses Zusammentreffen in zwei anderen Fällen durch Brieger und Stadthagen²⁾ später bestätigt worden ist, war es interessant, in diesem Falle die Untersuchung der Fäces zu wiederholen, welche früher von Baumann und v. Udránszky³⁾, später von García⁴⁾ bei demselben Patienten ausgeführt worden ist.

Folgende Tabelle gibt die Zahlen der gefundenen Mengen der Dibenzoylverbindungen der Diamine in den Fäces.

	Menge des Harns pro Tag.	Specificisches Gewicht.	Reaction des Harns.	Menge des Cystins.	Menge der Diamine in Fäces in Form der Dibenzoylverbindungen.
1. Tag.	2000	1,020	saure	0,994 gr.	} 3,892 gr.
2. »	1700	1,016	neutrale	—	
3. »	2400	1,010	neutrale	—	
4. »	1500	1,017	alkalische	—	

Wir bestimmten die Diamine nach den Methoden von Baumann und v. Udránszky. Bei der von ihnen angegebenen Trennung der Dibenzoylverbindungen der Diamine ergab sich, dass beinahe ausschliesslich Putrescin (Schmelzpunkt der Benzoylverbindung 170°) und nur Spuren von Cadaverin vorhanden waren.

Baumann und v. Udránszky fanden in den Fäces dieses Kranken im Jahre 1888 pro Tag im Mittel — 1,545 gr.

1889

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie, J. 1889, Bd. XIII, S. 562. Zeitschrift f. physiol. Chem., J. 1891, Bd. XV, S. 77.

²⁾ Berliner klinisch. Wochenschrift, J. 1889, Nr. 16.

³⁾ L. c.

⁴⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie, J. 1893, Bd. XVII, S. 577.

Dibenzoylverbindungen; im Jahre 1891 — 1,557 gr., welche zum grösseren Theil aus Putrescin (95,2%) und nur ein wenig aus Cadaverin (4,8%) bestanden. Garcia fand im Jahre 1892 bei verschiedenen Diäten ganz verschiedene Werthe: bei gewöhnlicher Nahrung 1,1349 gr., bei Zugabe von Käse zu der gewöhnlichen Diät 1,3918 gr. und bei kohlenhydratreicher Nahrung 0,741 gr. Dibenzoylverbindungen pro Tag, welche nur aus Putrescin bestanden. Wir haben (Ende des Jahres 1893) etwas grössere Werthe gefunden — 2,061 gr. pro Tag, was wahrscheinlich von der Diät und von der Intensität der Fäulniss im Darm abhängt, wofür auch einzelne Werthe von Baumann und v. Udránszky und von Garcia sprechen, welche in einigen Tagen die Menge der Dibenzoylverbindungen aus den Fäces beinahe bis auf 3 gr. (2,856 gr.) steigen sahen.