

Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn.

Von
Otto Folin.

(Aus dem chemischen Laboratorium des MacLean Hospital für Irrenkranke,
Waverley, Mass., U. S. A.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Februar 1904.)

- I. Eine neue Methode zur Bestimmung des Kreatinins im Harn.
- II. Über das Vorkommen von Kreatin im normalen Harn, und über die quantitative Bestimmung etwa vorhandenen Kreatins.
- III. Über die Darstellung von Kreatinin aus dem Harn.
- IV. Über die Bestimmung des Kreatininstickstoffs nach Kjeldahl.

I.

Es gibt wohl keinen wichtigen Bestandteil im Harn, dessen quantitative Bestimmung in jeder Hinsicht so unbefriedigend ist wie die des Kreatinins. Mit möglichst vollständigen Analysen des Harns von Irrenkranken beschäftigt, ist mir dieser Mangel in der Methodik der Harnanalyse sehr lästig gefallen, denn es gibt ja normalerweise nur zwei Bestandteile (Harnstoff und Ammoniak), deren Stickstoffgehalt in Prozenten des gesamten Stickstoffs des Harns berechnet größer ist als der des Kreatinins. Im Winter 1902—3 unternahm ich es daher, diese Lücke auszufüllen und, da die damals ausgearbeitete Methode während der letzten neun Monate mit etwa 150 Harnen anscheinend zuverlässige Werte gegeben hat, glaube ich mit der Veröffentlichung der Methode nicht länger zögern zu müssen.

Die hier zu beschreibende Methode ist eine kolorimetrische, begründet auf die von Jaffé¹⁾ entdeckte Reaktion des Kreatinins mit alkalischer Pikrinsäurelösung. Da nach Jaffé kein anderer Bestandteil des Harns eine ähnliche Reaktion gibt,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 399 (1886).

schien es des Versuches wert, diese Reaktion auch für quantitative Zwecke anzuwenden. Bei den folgenden Untersuchungen habe ich selbstverständlich die Möglichkeit, daß diese Angabe Jaffé's unrichtig sein könne, nie aus den Augen verloren. Ich habe aber neben dem von Jaffé erwähnten Aceton nur Acetessigsäure, Acetessigäther und Schwefelwasserstoff — also alles pathologische, und dazu aus Harnen leicht zu entfernende Substanzen, als störend gefunden.

Als Resultat vielfacher Untersuchungen bezüglich der Reaktion des Kreatinins mit alkalischer Pikrinsäurelösung hat sich folgendes ergeben:

10 mg Kreatinin in 10 cem Wasser gelöst gibt die maximale Rotfärbung fünf bis zehn Minuten nach Zusatz von 15 cem 1,2%iger Pikrinsäurelösung und 4 bis 8 cem 10%iger Natronlauge. Die in dieser Weise erhaltene Lösung auf 500 cem verdünnt gibt eine Flüssigkeit, von der 8,1 mm in durchfallendem Lichte genau dieselbe Farbe hat wie 8 mm ⁿ 2 Kaliumbichromatlösung.

Dieses Verhältnis wurde mehrmals unter Anwendung von analysereinem Kreatinin, Kreatin (vor den Versuchen durch Erhitzen mit Salzsäure in Kreatinin umgewandelt) sowie von dem Doppelpikrat von Kalium und Kreatinin ausprobiert. Ich glaube daher für die Richtigkeit dieses Befundes einstehen zu können.

Um diesen Wert festzustellen und um Kreatininbestimmungen nach diesem Prinzip auszuführen, ist ein kolorimetrischer Apparat notwendig, der genaue Ablesungen der Säulenhöhe der angewandten Flüssigkeiten bis auf ein zehntel Millimeter gestattet. Ein solcher äußerst bequemer und leicht zu handhabender Kolorimeter ist der französische Apparat von Duboscq, der bei diesen Untersuchungen benutzt wurde.

Um den oben mitgeteilten maximalen kolorimetrischen Wert von 10 mg Kreatinin in angedeuteter Weise für quantitative Zwecke anzuwenden, mußten noch folgende zwei Fragen beantwortet werden:

Ist die durch alkalische Pikrinsäure erzeugte Färbung genügend beständig? Dieselbe muß nämlich wenigstens einige

Minuten unverändert bleiben, um genaue Ablesungen des kolorimetrischen Wertes zu ermöglichen. Diese Frage kann wohl bejaht werden, nicht aber im Sinn Jaffés. Die Stärke der Färbung ist nämlich während der ersten wenigen (10) Minuten unverändert, schon nach einer halben Stunde ist sie aber entgegen den Angaben Jaffés merklich abgeschwächt. Es ist nicht zu verwundern, daß diese Verhältnisse den qualitativen Beobachtungen Jaffés entgangen waren: die hier erwähnten genauen Messungen deckten dieselben aber sofort auf.

Mehrere Versuche wurden angestellt, um die entstehende Rotfärbung längere Zeit haltbar zu machen, aber vergebens. Wechselnde Mengen Alkali und Pikrinsäure, Abschluß von Licht, Abkühlung, Zusatz von Nicht-Elektrolyten waren alle ungenügend, um dies zu bewirken. Doch ist die Unbeständigkeit der durch alkalische Pikrinsäure erzeugten Rotfärbung, wie gesagt, von keiner praktischen Bedeutung, denn die ganze Kreatininbestimmung nimmt höchstens zehn Minuten in Anspruch.

Die zweite, sehr wichtige Frage ist: wie verhält sich die durch Kreatinin und alkalische Pikrinsäure erzeugte Färbung unter verschiedenen Verdünnungen? Glücklicherweise kann auch diese Frage dahin beantwortet werden, daß mäßige Veränderungen in der Verdünnung, wie es praktische Harnanalysen erfordern, ohne wesentliche Bedeutung sind. Zur Illustration seien folgende Experimente angeführt:

Versuch 1. 10 mg Kreatinin, nach Zusatz der oben erwähnten Mengen Pikrinsäure und Natronlauge, und darauf auf 500 cem verdünnt, erfordern, wie schon erwähnt, **8,1** mm, um dieselbe Farbe wie 8 mm $n/2$ Kaliumbichromatlösung zu liefern.

Versuch 2. 10 mg Kreatinin wie in 1 behandelt, aber vor den kolorimetrischen Beobachtungen nur auf 250 cem (anstatt auf 500 cem) verdünnt, erforderte **4,2** mm (anstatt 4,05), um dieselbe Farbe wie 8 mm $n/2$ Kaliumbichromatlösung zu liefern.

Versuch 3. 10 mg Kreatinin mit denselben Reagentien in derselben Weise behandelt, aber auf 1000 cem vor den kolorimetrischen Beobachtungen verdünnt, erforderte **15,9** mm (anstatt 16,2 mm), um dieselbe Farbe wie 8 mm $n/2$ Kaliumbichromatlösung zu liefern.

Wenn die bei der ersten Verdünnung (10 mg Kreatinin pro 500 ccm) erhaltene Zahl 8,1 mm als Normalwert angenommen wird, wie dies bei meinen Kreatininbestimmungen der Fall ist, so entspricht die in 2 erhaltene Ablesung 9,64 mg Kreatinin und die in 3 erhaltene 10,2 mg — anstatt der wirklich vorhandenen 10 mg Kreatinin. Da die hier angewandten Veränderungen in der Verdünnung weit größer sind, als praktische Bestimmungen im Harn sie erfordern, so ist es klar, daß hier keine bedeutende Quelle der Ungenauigkeit steckt.

Denjenigen, welcher mit Färbereaktionen vertraut ist, mag es etwas befremden, daß die hier in Frage stehende, verhältnismäßig labile, organische Färbesubstanz sich so wenig mit der Verdünnung verändern sollte. Tatsächlich ist die durch Verdünnung erzeugte Veränderung weit größer, als durch die gegebenen Versuche angedeutet wird, und zwar in entgegengesetzter Richtung. Aus den Zahlen würde man zu der Schlußfolgerung kommen, daß die Färbung durch ein rotgefärbtes Ion bedingt sei und daß die entsprechende Dissociation mit größerer Verdünnung ein wenig vermehrt wird. Dies ist aber nicht der Fall. Mit der Verdünnung wird die gesamte Farbe der Flüssigkeit im Gegenteil vermindert. Nur kommt diese Tatsache bei der angegebenen Arbeitsweise nicht zum Vorschein, weil ein anderer Faktor Veränderungen in entgegengesetzter Richtung verursacht und die wahre Wirkung der Verdünnung verdeckt. Dieser Faktor ist die zunehmende Farbe pro Millimeter bei Anwendung von zunehmenden Volumina oder richtiger gesagt Säulenhöhen für kolorimetrische Beobachtungen. Diese Verhältnisse werden am besten durch ein paar Versuche klargestellt.

Versuch 4. (Einfluß der Verdünnung allein.) a) 10 ccm Harn mit 15 ccm Pikrinsäurelösung und 5 ccm Natronlauge behandelt, auf 250 ccm verdünnt und sodann mit 8 mm $\frac{n}{2}$ Kaliumbichromatlösung verglichen, ergab den kolorimetrischen Wert **5,2** mm.

b) 10 ccm des Harns in derselben Weise behandelt, aber auf 500 ccm (anstatt auf 250 ccm) verdünnt und analysiert mit 4 mm (anstatt 8 mm) $\frac{n}{2}$ Kaliumbichromatlösung verglichen, ergab bei der kolorimetrischen Beobachtung **6,3** mm, anstatt 5,2 mm.

Versuch 5. (Einfluß wechselnder Säulenhöhe allein.) a) 10 ccm einer Kreatininlösung (4,6 mg enthaltend) mit Pikrinsäure und Natronlauge wie oben behandelt und auf 250 ccm verdünnt, wurde mit 8 mm $\frac{n}{2}$ Kaliumbichromat verglichen. Die Beobachtung ergab 9 mm als den Vergleichswert der Lösung.

b) Dieselbe Pikrinsäure-Kreatininlösung wurde sogleich darauf mit 25 mm $\frac{n}{2}$ Kaliumbichromatlösung (anstatt mit 8 mm) verglichen. Die Beobachtung ergab nun nur 20,3 mm anstatt der berechneten 28,2 mm.

Aus Versuch 4 ist ersichtlich, daß die wahre, durch Verdünnung erzeugte Veränderung in der Farbe eine nicht unbedeutende Verminderung ausmacht. Bei doppelter Verdünnung ist die Farbe um 17,5 % vermindert. Aus Versuch 5 ist ersichtlich, daß die zum Vorschein kommende rote Farbe noch mehr durch die, zur Beobachtung benutzte, Säulenhöhe der Flüssigkeit bedingt ist. Bei Anwendung von einer Säulenhöhe von 25 mm $\frac{n}{2}$ Kaliumbichromatlösung anstatt 8 mm, als Vergleichszahl, erschien die pro Millimeter vorhandene Farbe um 28 % vermehrt zu sein.

Durch einen glücklichen Zufall decken diese Veränderungen sich fast vollständig, wie aus Versuchen 1—3 zu entnehmen ist, so daß bei der praktischen Ausführung der Versuche mäßige Veränderungen in der Verdünnung ohne wesentliche Bedeutung sind.

Nach diesen Vorbemerkungen möchte ich sogleich die hier in Frage stehende Kreatininbestimmung im normalen Menschenharn beschreiben.

Erforderlich sind:

1. Ein zwei Röhren enthaltender Kolorimeter, in welchem die Höhe der anzuwendenden Flüssigkeiten bis auf $\frac{1}{10}$ mm eingestellt werden kann.

2. Eine halbnormale Kaliumbichromatlösung, 24,54 g pro Liter enthaltend. (Diese Lösung hält sich Jahre lang unverändert.)

3. Eine annähernd gesättigte (1,2 %ige) Pikrinsäurelösung.

4. 10 %ige Natronlauge.

Ausführung:

$n/2$ Kaliumbichromatlösung wird in das eine Rohr des Kolorimeters gegossen und genau bis auf 8 mm eingestellt. Um mit möglichst großer Sicherheit zu arbeiten, empfiehlt es sich, etwas $n/2$ Bichromatlösung auch in das zweite Rohr des Kolorimeters einzugießen und mit dieser Lösung den kolorimetrischen Gleichspunkt aufzusuchen. Das Mittel von drei oder vier Beobachtungen darf nicht mehr als 0,1 mm vom richtigen Wert (8 mm) abweichen und die Differenz zwischen je zwei Beobachtungen soll 0,3 mm nicht überschreiten. Nach einiger Übung ist der richtige Punkt leicht und sicher aufzufinden.

10 ccm Harn werden jetzt in einen 500 ccm-Meßkolben abgemessen und 15 ccm Pikrinsäurelösung und 5 ccm Natronlauge denselben zugesetzt. Die entstehende Flüssigkeit wird ein paarmal geschüttelt und fünf Minuten ruhig stehen gelassen. Am Ende dieser Zeit wird der Meßkolben bis zum 500 ccm-Strich mit Wasser aufgefüllt und die entstehende Lösung gut gemischt. Das zweite Rohr des Kolorimeters wird nun sogleich mit dieser Lösung ausgespült und der kolorimetrische Wert der Lösung wird ganz wie vorher mittels der in dem anderen Rohr des Kolorimeters vorhandenen 8 mm Kaliumbichromatlösung bestimmt.

Die dem kolorimetrischen Werte entsprechenden Mengen Kreatinin sind leicht auf Grund des oben (S. 224) gegebenen Faktors 8,1 zu berechnen. Nehmen wir an, daß drei Beobachtungen die kolorimetrischen Werte 7,3 mm, 7,1 mm und 7,2 mm ergeben, im Mittel also 7,2 mm, so berechnet sich der Kreatiningehalt in 10 ccm Harn demnach auf $\frac{8,1}{7,2} \times 10$ oder 11,25 mg.

Geben die kolorimetrischen Beobachtungen Werte unter 5 mm, dann macht man eine zweite Bestimmung unter Anwendung von nur 5 ccm Harn. Oder 25 ccm Harn werden zuerst mit 25 ccm Wasser verdünnt und die Bestimmung wird mit 10 ccm verdünnten Harns wiederholt. Oder die Bestimmung wird mit 10 ccm nicht verdünnten Harns unter Anwendung von einem 1000 ccm-Meßkolben wiederholt.

Gibt die erste kolorimetrische Untersuchung andererseits

Werte, die über 13 mm liegen, dann wird die Bestimmung mit 20 cem Harn wiederholt. Mit anderen Worten: Die zur Anwendung kommenden Mengen Harn sollen 7–15 mg Kreatinin pro 500 cem Flüssigkeit enthalten.

Hier muß vor allem davor gewarnt werden, keine anderen Werte als 8 mm $n/2$ Kaliumbichromatlösung (oder 40 mm $n/10$ -Lösung) als Vergleichszahl anzuwenden, denn die mit anderen Mengen Bichromatlösung erhaltenen Werte sind nicht richtig unter Anwendung des oben gegebenen Faktors 8,1 mm für 10 mg Kreatinin (wie ja ganz klar dem oben zitierten Versuche Nr. 5 zu entnehmen ist). Dieser Wert schien mir sehr gut geeignet, um genaue kolorimetrische Beobachtungen zu erstatten. Jeder, der andere Werte benutzen will, muß zuerst mit bekannten Mengen Kreatinin eine Normalzahl feststellen.

Zum Schluß gestatte ich mir zu bemerken, daß ich über etwa 150 Kreatininbestimmungen in Harnen von Irrenkranken verfüge. Da die Mehrzahl von diesen bald im Zusammenhang mit genauen Stoffwechseluntersuchungen zur Veröffentlichung kommen werden, möchte ich es unterlassen, dieselben hier weiter zu berühren. Nur dies sei noch einmal bemerkt, daß diese ziemlich umfangreichen Stoffwechseluntersuchungen mir keinen Grund gaben, die Richtigkeit der erhaltenen Kreatininzahlen zu bezweifeln. Auch meine Erfahrungen bei der unten zu beschreibenden Darstellung von Kreatinin aus Harn sprechen zugunsten der Zuverlässigkeit meiner analytischen Bestimmungen, insbesondere die Tatsache, daß alles kolorimetrisch nachweisbare Kreatinin bis auf 1,25 mg pro 10 cem Harn durch Sättigung mit Pikrinsäure ausgefällt wird. Der zurückbleibende Rest ist in jedem Harn derselbe, mag der Harn ursprünglich viel oder wenig Kreatinin enthalten haben. Er entspricht der Löslichkeit des Pikrinsäuredoppelsalzes von Kalium und Kreatinin von nur 68,7 mg pro 100 cem. Jaffé (loc. cit. S. 397) fand die Löslichkeit dieses Salzes (in Wasser) zu 180,6 mg pro 100 cem.

Indessen bin ich mir wohl bewußt, daß ich die Zuverlässigkeit dieser Methode noch nicht mit aller Schärfe bewiesen habe, aber das ist ja auch nicht der Fall für irgend welche andere Methode zur Bestimmung des Kreatinins.

Die Neubauersche Methode zur Bestimmung des Kreatinins, die ja als die einzig brauchbare eine etwas allgemeinere Anwendung gefunden hat, ist nicht nur äußerst mühsam und zeitraubend, sondern auch unzuverlässig. Doch scheint gerade die Unzuverlässigkeit dieser Methode nicht allgemein bekannt zu sein, obwohl das Wichtigste, was wir der letzten dieses Thema betreffenden Abhandlung Salkowskis¹⁾ entnehmen können, gerade der Nachweis dieser Unzuverlässigkeit ist. Salkowski selbst hat diese Schlußfolgerung aus dem einen oder anderen Grunde nicht sehr deutlich hervorgehoben (siehe aber S. 474) und sie scheint daher auch von anderer Seite keine Beachtung gefunden zu haben. Das verhältnismäßig sehr spärliche Vorkommen von Kreatininbestimmungen in der voluminösen Harnliteratur ist aber vielleicht eben so sehr auf ein mehr oder minder ausgesprochenes Mißtrauen gegen die Zuverlässigkeit dieser Methode als auf deren Umständlichkeit zurückzuführen.

Gegenüber der Neubauerschen Methode bietet die hier beschriebene den nicht unbedeutenden Vorteil, daß sie gestattet, eine Kreatininbestimmung in 10—15 Minuten und unter Anwendung von nur 10—20 ccm Harn auszuführen.

II.

Weder das Vorhandensein noch das Nichtvorhandensein des Kreatins in normalem Menschenharn ist bis jetzt erwiesen. Diese Lücke in unserer Kenntnis des Harns ist dadurch bedingt, daß das Kreatin keine charakteristischen Eigenschaften besitzt, die den qualitativen Nachweis etwa vorhandener kleiner Mengen desselben im Harn gestattet, und weiter dadurch, daß bei der Neubauerschen Methode zur Bestimmung des Kreatinins dasselbe nicht scharf von etwa beigemengten Mengen Kreatins getrennt werden kann. Meine oben geschilderte Methode zur Bestimmung des Kreatinins scheint aber sehr gut geeignet, um diese Lücke in unseren Kenntnissen des Harns zu füllen, denn durch vielfache Versuche habe ich mich überzeugt, daß das

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 471 (1890).

Kreatinin auch bei Anwesenheit von noch so großen Mengen Kreatins nach dieser Methode gesondert bestimmt wird.

Um das Kreatin im Harn nachzuweisen bzw. quantitativ zu bestimmen, wird deshalb zuerst der Gehalt des präformierten Kreatinins festgestellt. In einer anderen Probe des Harns wird das etwa vorhandene Kreatin durch geeignete Behandlung in Kreatinin übergeführt und die dadurch erzeugte Vermehrung des letzteren durch eine zweite kolorimetrische Beobachtung bestimmt.

Die Bedingungen für die quantitative Überführung kleiner Mengen Kreatins (etwa 10—200 mg) in Kreatinin durch Erhitzen mit verdünnter Salzsäure wurden schon in Zusammenhang mit der Feststellung des kolorimetrischen Wertes des Kreatinins ermittelt. (Über die quantitative Umwandlung größerer Mengen Kreatins siehe unten S. 238.) Aus diesen Untersuchungen entnehme ich folgendes: 5—10 mg Kreatin + 10 ccm Wasser und 5 ccm normale Salzsäure werden durch dreistündiges Erhitzen auf 90°, oder auf dem Wasserbade, quantitativ in Kreatinin umgewandelt. Nach zweistündigem Erhitzen auf 90° ist nur etwa 80% des vorhandenen Kreatins in Kreatinin übergeführt.

Durch dreistündiges Erhitzen von 10 ccm Harn + 5 ccm normaler Salzsäure auf dem Wasserbade ist demnach sicher alles vorhandene Kreatin in Kreatinin umgewandelt. Durch solches Erhitzen wird der Harn deutlich braun gefärbt, doch ist diese gleich der ursprünglichen Färbung des Harns nach der Verdünnung auf 500 ccm kaum mehr wahrnehmbar.

Aus meinem Protokolle entnehme ich nun einige in dieser Richtung ausgeführte Versuche, um die Frage des Vorhandenseins des Kreatins im Harn zu beleuchten.

Harn Nr. 1. Spez. Gewicht 1,014. Acidität = 7 ccm $n/10$ pro 25 ccm.

a) 10 ccm Harn + 15 ccm Pikrinsäurelösung + 5 ccm Natronlauge, nach fünf Minuten auf 250 ccm verdünnt, ergab eine Flüssigkeit, von der 7,8 mm kolorimetrisch 8 mm $n/2$ Kaliumbichromatlösung gleich war. Demnach waren 5,3 mg Kreatinin vorhanden.

b) 10 ccm wurden nun vor der Kreatininbestimmung 4 Stunden lang mit 5 ccm n/HCl erhitzt. Bei gleicher Ver-

dünnung (250 ccm) wurde nun der kolorimetrische Wert 6,6 mm, entsprechend **6,15** mg Kreatinin gefunden.

Dieser Harn enthielt also 5,3 mg präformiertes Kreatinin und daneben eine 0,85 mg Kreatinin entsprechende Menge Kreatin — also **0,99** mg. (1 mg Kreatin entspricht 1,16 mg Kreatinin.)

Dieser Harn wurde zwei Wochen lang unter Zusatz von Chloroform und Thymol aufbewahrt. Die Kreatininbestimmung vor und nach der Salzsäurebehandlung ergaben dann die folgende Werte:

a) Die direkte Kreatininbestimmung ergab den kolorimetrischen Wert 8,8 mm, entsprechend **4,6** mg Kreatinin pro 10 ccm Harn.

b) Nach 4stündigem Erhitzen mit Salzsäure wurde der kolorimetrische Wert 6,7 mm, entsprechend **6,05** mg Kreatinin gefunden.

Nach zwei Wochen hatte sich also 0,7 mg Kreatinin, entsprechend 13,2% des ursprünglich vorhandenen Kreatinins in Kreatin umgewandelt. Die Acidität des Harns war diesmal 6,7 ccm ⁿ/₁₀ pro 25 ccm — also keine bemerkenswerte Veränderung.

Harn Nr. 2.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 ccm auf 500 ccm verdünnt, ergab 6,4 mm, entsprechend 12,5 mg Kreatinin.

b) Nach zwei Wochen ergab die direkte Kreatininbestimmung 7,3 mm entsprechend 11,1 mg Kreatinin.

c) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden diesmal 6,6 mm, entsprechend 12,3 mg Kreatinin erhalten.

Dieser Harn enthielt also ursprünglich kein Kreatin; nach zwei Wochen aber hatte sich 1,4 mg Kreatinin (11,2%) in Kreatin umgewandelt.

Harn Nr. 3. Acidität = 8 ccm ⁿ/₁₀ pro 25 ccm.

a) Kreatininbestimmung direkt (10 ccm auf 1000 ccm verdünnt) ergab 8,5 mm = 19,1 mg Kreatinin pro 10 ccm.

b) Nach Erhitzen mit 5 ccm ⁿ.HCl wurde 8,5 mm, entsprechend 19,1 mg Kreatinin erhalten. Dieser Harn enthielt demnach kein Kreatin.

Nach 7tägigem Aufbewahren ergab eine direkte Kreatininbestimmung genau denselben Wert (8,5 mm) 19,1 mg Kreatinin.

Auch nach dieser Zeit war also in diesem Harn kein Kreatin vorhanden.

Harn Nr. 4. Spez. Gewicht 1,0225, Acidität 13,5 cem pro 25 cem.

a) Kreatininbestimmung direkt (10 cem auf 500 cem verdünnt) ergab 7 mm, entsprechend 11,6 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden 6,9 mm erhalten, entsprechend 11,7 mg Kreatinin.

Also auch hier kein Kreatin.

Nach einer Woche wurden nochmals (ohne Erhitzen mit Salzsäure) 7 mm entsprechend 11,6 mg Kreatinin erhalten.

Harn Nr. 5. Frisch gelassen 10 Uhr vormittags.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 cem auf 1000 cem verdünnt ergab 8 mm = 20,25 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden erhalten 7,65 mm, entsprechend 21,2 mg Kreatinin.

Dieser Harn enthält demnach 20,25 mg Kreatinin und 1,1 mg Kreatin pro 10 cem.

Harn 6. Von demselben Tage und der gleichen Versuchsperson 3.30 nachmittags erhalten.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 cem auf 1000 cem verdünnt ergab 9,3 mm = 17,4 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden erhalten 9 mm, entsprechend 18 mg Kreatinin.

Diese Harnprobe enthielt demnach 17,4 mg Kreatinin und 0,7 mg Kreatin.

Aus Stickstoffbestimmungen in den letzten zwei Harnproben ergab es sich, daß der Kreatininstickstoff 5,6% resp. 5,8% des gesamten Stickstoffs repräsentierte.

Harn Nr. 7. An demselben Tage wie Harn Nr. 5 10 Uhr vormittags gelassen.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 cem (auf 1000 cem verdünnt) ergab 7,6 mm, entsprechend 21,3 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden erhalten 7,55 mm. (Also kein Kreatin.)

Der Stickstoff des Kreatinins entsprach hier 6,4% des Gesamtstickstoffbedarfs.

Harn Nr. 8. Von derselben Versuchsperson 3.30 nachmittags gelassen.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 ccm (auf 1000 ccm verdünnt) ergab 9,8 mm, entsprechend **16,6** mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden genau dieselben Werte erhalten. Also auch hier kein Kreatin.

Der gefundene Kreatininstickstoff entsprach 5,54% des Gesamtstickstoffs.

Harn Nr. 9. Dieser Harn wurde von einer dritten Versuchsperson an demselben Tage wie die Harne Nr. 5 und 7 (11.30 vormittags) gelassen.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 ccm (auf 1000 ccm verdünnt) ergab 12,4 mm, entsprechend 13,1 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden erhalten 11,65 mm, entsprechend 14 mg Kreatinin.

Dieser Harn enthielt also **13,1** mg Kreatinin und **1** mg Kreatin pro 10 ccm.

Der Kreatininstickstoff entsprach 3,44% des Gesamtstickstoffs.

Harn Nr. 10. Diese Harnprobe bestand aus einem Gemenge von »Morgenharnen« von fünf normalen Personen. Die Kreatininbestimmung wurde um 8 Uhr, also etwa 2 Stunden nachdem der Harn gelassen wurde, ausgeführt.

a) Direkte Kreatininbestimmung in 10 ccm (auf 1000 ccm verdünnt) ergab 8,2 mm, entsprechend 19,8 mg Kreatinin.

b) Nach dem Erhitzen mit Salzsäure wurden erhalten 7,8 mm, entsprechend 20,8 mg Kreatinin.

Diese Harnprobe enthielt also **19,8** mg Kreatinin und **1,16** mg Kreatin.

Der Kreatininstickstoff entsprach 6% des Gesamtstickstoffs.

Aus den obigen, mit normalen Harnen ausgeführten Versuchen ist ersichtlich, daß solche Harne bisweilen ganz bemerkbare, öfters aber nur minimale Mengen oder auch gar kein Kreatin enthalten.

Es wäre wohl ganz interessant, diese Versuche auf eine große Reihe normaler und pathologischer Harne auszudehnen. Mit andern Arbeiten beschäftigt, habe ich dies aber unterlassen müssen.

III.

Um meine analytischen Untersuchungen des Kreatinins zu vollenden, schien es mir notwendig, einige Gramm analysenreiner Substanz in Händen zu haben. Wegen der außerordentlichen Kostspieligkeit des Kreatinins (es kostet etwa 80 Mk. pro Gramm in Amerika) unternahm ich es, dasselbe aus Harn darzustellen und bin ich dabei zu einem Verfahren gekommen, das, wie es mir scheint, weit zweckmäßiger ist, als jede der bisher gebräuchlichen Methoden.

Als Ausgangspunkt auch für diese Arbeit wurde die schöne Untersuchung Jaffés «Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt etc.» (loc. cit.) gewählt.

Normaler Menschenharn, Spez. Gewicht 1,020–1,025, enthält 15 bis 20 mg Kreatinin pro 10 ccm. Durch Sättigung desselben mit Pikrinsäure wird alles Kreatinin bis 1,25 mg pro 10 ccm in wenigen Minuten gefällt. Die entstandene Fällung besteht bis zu 75–90 % aus dem von Jaffé beschriebenen Doppelpikrat von Kreatinin und Kalium. Diese Tatsachen konnte ich leicht kolorimetrisch feststellen. Sie bildeten die Grundlage, auf welcher folgendes Verfahren aufgebaut wurde.

18 g Pikrinsäure, für je einen Liter Harn, werden abgewogen und in kochendem Alkohol gelöst (100 ccm Alkohol für je 40 g Pikrinsäure). Diese heiße Lösung wird unter kräftigem Umrühren in den Harn gegossen. Das Umrühren wird ein paar Minuten fortgesetzt (ohne die Wände des Gefäßes zu berühren!), bis die Ausfällung des Pikrats beginnt. Nach einer halben bis drei viertel Stunde ist nun beinahe alles Kreatinin in dem schweren sandigen Bodensatz enthalten. Die Flüssigkeit ist aber noch durch ausfallende Harnsäure getrübt. Diese Flüssigkeit wird nun möglichst vollständig ausgehebert und der Bodensatz auf dem Saugefilter mit gesättigter Pikrinsäurelösung gründlich gewaschen.

Aus dieser Fällung ist das Doppelpikrat von Kalium und Kreatinin leicht rein darzustellen, denn sie enthält zum Unterschied von der Fällung nur Spuren von Harnsäure. Viermaliges Umkrystallisieren aus heißem Wasser gibt das erwünschte Pikrat analysenrein.

Für die Darstellung des Kreatinins ist es aber unnötig, das Pikrat umzukristallisieren. Aus demselben kann das Kreatinin in beliebig konzentrierter Lösung direkt in folgender Weise erhalten werden: Das noch feuchte Präzipitat wird gewogen und mit etwa halb soviel Gewichtsteilen Kaliumbikarbonat und ca. 150 ccm Wasser pro je 4 l des angewandten Harns während einer Stunde in einer großen Reibschale verrieben. Das Kaliumbikarbonat bewirkt keine gegenseitige Zersetzung des Kreatinins und der Pikrinsäure, wie dies stärkere Alkalien tun, auch keine bemerkbare Umwandlung des Kreatinins in Kreatin. Durch diese Behandlungsweise geht aber das Kreatinin quantitativ in Lösung und die entsprechende Pikrinsäure wird in das schwerlösliche Kaliumsalz übergeführt. Letzteres wird auf dem Saugfilter abfiltriert und mit kleinen Mengen Kaliumbikarbonatlösung gewaschen. Die kolorimetrische Untersuchung zeigt jetzt, daß die Fällung kreatininfrei ist und daß das schwach rotgefärbte Filtrat das ursprünglich im Harn vorhandene Kreatinin enthält.

Diese Lösung, die das Kreatinin neben Kaliumbikarbonat und kleinen Mengen von Verunreinigungen enthält, wird vorsichtig mit 20%iger Schwefelsäure neutralisiert. Die schwach saure Lösung wird darauf mit zwei Volumina Methyl- oder Athylalkohol vermischt und sogleich (ohne zu filtrieren) mit kleinen Mengen Tierkohle (etwa 50 g pro je 8 l Harn) entfärbt. Nach einigen Minuten wird filtriert, um die Tierkohle und fast das gesamte, durch Alkohol ausgefällte Kaliumsulfat zu entfernen. Das schwach gelbgefärbte Filtrat wird am besten einige Stunden, oder bis am nächsten Tage, stehen gelassen und nochmals filtriert. Letzteres Filtrat enthält nun neben äußerst geringen Spuren von Kaliumsulfat das gesamte Kreatinin mit Ausnahme von kleinen Mengen (etwa 0,5 bis 1 g), die von der Tierkohle zurückgehalten wurden.

Bis zu diesem Punkt war die Untersuchung sehr einfach, und es gelingt leicht, fast das gesamte Kreatinin aus beliebig großen Harnmengen von fast allen anderen Bestandteilen des Harns zu trennen. Vielfache Versuche, aus der erhaltenen Lösung das Kreatinin direkt durch Konzentrieren und Umkristallisieren rein darzustellen, sind aber alle bisher ohne Erfolg

gewesen. Durch Anwendung von Zinkchlorid gelingt es aber leicht, vollständig reines Kreatinin zu erhalten. Das Verfahren ist folgendes:

Der Kreatininlösung wird konzentrierte Zinkchloridlösung allmählich zugesetzt, solange noch eine weitere Fällung entsteht, und das Ganze bis am nächsten Tage stehen gelassen. Das entstandene Doppelsalz wird abfiltriert und einige Male mit 50%igem Alkohol gewaschen. Wenn nicht allzu wenig Tierkohle zur Entfärbung angewandt wurde, so erhält man die Fällung vollständig weiß, sonst kann dieselbe schwach gelb gefärbt sein. Aus diesem Kreatininchlorzink wird nun das Kreatinin in bekannter Weise durch Behandlung mit Bleihydrat von Zink und Chlor befreit. Nach dem Kochen mit dem Bleihydrat, das in Überschuß vorhanden sein muß, empfiehlt es sich, Schwefelwasserstoff während einiger Minuten, d. h. bis die gesamte Fällung fast vollständig schwarz ist, durchzuleiten. Durch diesen kleinen Kunstgriff erhält man eine sehr leicht filtrierbare, anstatt der üblichen, äußerst schwierig zu filtrierenden, Mischung (natürlich muß das H_2S -Durchleiten nicht bis zu Zersetzung des Bleichlorids fortgesetzt werden). Das klare Filtrat wird jetzt durch Schwefelwasserstoff vollständig entbleit.

Die in dieser Weise erhaltene wasserklare Lösung enthält ein Gemenge von Kreatinin und Kreatin. Die Menge des Kreatins kann in einigen Minuten nach dem oben beschriebenen kolorimetrischen Verfahren festgestellt werden. Zu diesem Zwecke macht man zuerst einen orientierenden Versuch mit etwa 0,1 ccm Lösung, dann wird 1 ccm der Lösung verdünnt bis zu etwa 1 mg pro Kubikzentimeter. Die genaue Bestimmung wird mit dieser verdünnten Lösung angestellt.

Um das Kreatin, das neben dem Kreatinin vorhanden ist, genau zu bestimmen, nimmt man 5–10 ccm der verdünnten Lösung und erhitzt auf dem Wasserbade mit 5 ccm normaler Salzsäure während 3 Stunden. Jetzt wird das Gesamtkreatinin bestimmt und aus den erhaltenen Zahlen ist die Menge des Kreatins leicht zu berechnen.

Nach dem wohlbekannten Liebigschen Verfahren sollte nun die Kreatin und Kreatinin enthaltende Lösung konzentriert

werden, um zuerst das schwerlösliche Kreatin zu entfernen. Durch kolorimetrische Untersuchungen habe ich aber gefunden, daß es gar nicht leicht ist, Kreatin und Kreatinin in dieser Weise zu trennen, und ich bin überzeugt, daß viele von denjenigen, welche das Liebig'sche Verfahren benutzt haben, wohl reines Kreatin, nicht aber reines Kreatinin in dieser Weise erhalten haben. Ich bezweifle auch sehr die Richtigkeit der Liebig'schen Angabe, daß Kreatin durch Erhitzen mit molekularen Mengen Schwefelsäure unter den von ihm angegebenen Bedingungen quantitativ in Kreatinin umgewandelt wird.

Um das Gemenge von Kreatin und Kreatinin quantitativ als Kreatinin zu erhalten, habe ich daher das folgende Verfahren ausprobiert: Entsprechend je 4 g des obigen Gemenges werden 50 ccm normaler Schwefelsäure der Lösung zugesetzt. Diese Lösung wird dann durch Kochen eingedampft, bis das Volumen der Flüssigkeit etwa der Menge zugesetzter Normal-säure entspricht, und darauf 36 bis 48 Stunden lang auf dem Wasserbade erhitzt. Erst nach solchem langwierigen Erhitzen habe ich das Kreatin quantitativ in Kreatinin umgewandelt gefunden. Eine Baryumhydratlösung, titrimetrisch der zugesetzten Schwefelsäure entsprechend, wird dann in das Kreatininschwefelsäuregemisch eingegossen. Nach einer halben Stunde wird das Baryumsulfat abfiltriert und das Filtrat und Waschwasser rasch über der freien Flamme durch Kochen konzentriert, bis in der noch kochenden Flüssigkeit ein Teil des gelösten Kreatinins schon ausgefallen ist. Nach dem Erkalten ist die ganze Flüssigkeit gewöhnlich erstarrt. Die Mutterlauge wird auf dem Saugfilter abgesaugt und das Kreatinin mit kleinen Mengen Alkohol zwei oder dreimal gewaschen. Durch zweimaliges Umkristallisieren ist das in dieser Weise erhaltene Kreatinin analysenrein.

IV.

In mehreren schnell aufeinander folgenden Abhandlungen verschiedener Forscher sind die von Kutscher und Steudel gehegten Zweifel an der Anwendbarkeit des Kjeldahl'schen Prinzips bei Stickstoffbestimmungen in gewissen einfachen Ver-

bindungen von physiologischer Bedeutung als unbegründet bezeichnet.¹⁾ Mit der genauen Arbeitsweise Kutschers persönlich bekannt, unternahm ich es, trotz der oben erwähnten Mitteilungen, die Kjeldahlsche Methode auf ihre Genauigkeit noch einmal zu prüfen. Hier möchte ich einige dieser mit Kreatinin angestellten Versuche anführen, denn sie geben ja auch Aufschluß darüber, inwieweit das nach meiner Methode dargestellte Kreatinin als rein anzusehen ist.

Zuerst sei mir gestattet, einige kurze Bemerkungen über die Methode Kjeldahls im allgemeinen vorzuschicken.

Das Kjeldahlsche Prinzip wird der Hauptsache nach als ein Oxydationsvorgang aufgefaßt und aus diesem Grunde wird die Reaktion (nach vielen Forschern) zuletzt durch Zusatz von einem kräftigen Oxydationsmittel (Kaliumpermanganat) vollendet. Bei hoch komplizierten, organischen Substanzen, wie den Eiweißkörpern oder Getreidesubstanzen, ist diese Auffassung unzweifelhaft insofern richtig, als die Reaktion von ziemlich kräftigen Oxydationsvorgängen begleitet sein muß. Diese Oxydationsvorgänge sind auf die Zersetzung der Schwefelsäure zurückzuführen. Die erhitzte Schwefelsäure zerfällt bei den hohen Temperaturen in Wasser und Schwefeltrioxyd. Letzteres ist ein ziemlich unbeständiger Körper und zerfällt weiter, besonders bei Anwesenheit von oxydablen Substanzen, in Schwefeldioxyd und Sauerstoff. Die praktische Darstellung von SO_2 und Sulfiten aus H_2SO_4 ist ja auf dieser Reaktion begründet.

Der Hauptsache nach erscheint mir aber die Kjeldahlsche Reaktion nicht ein Oxydations-, sondern ein hydrolytischer Spaltungsvorgang zu sein. Bei einfachen chemischen Verbindungen, wie Kreatin, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Guanidin usw., handelt es sich meiner Ansicht nach ausschließlich um hydrolytische Spaltungsvorgänge (abgesehen von der Oxydation etwa vorhandener Alkylgruppen, wie in Kreatin und Kreatinin). Die

¹⁾ Kutscher und Steudel, Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 12.
 Beger, Fingerling u. Morgen, Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 329.
 Malfatti, Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 467.
 Sörensen und Padersen, Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 513.
 Schöndorff, Pflügers Archiv, Bd. 98, S. 130.

Vorstellungen Malfattis (*loc. cit.*) über die Kjeldahlsche Reaktion bei diesen Verbindungen scheinen mir daher nicht zutreffend zu sein. Die Zersetzung des von ihm als Beispiel herangezogenen Guanidins ist als eine reine hydrolytische Spaltung zu bezeichnen, für deren Stattfinden kein «Sauerstoff» und kein reduzierender Körper notwendig ist. $(\text{HNC}(\text{NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} = 3\text{NH}_3 + \text{CO}_2)$. Die Schwefelsäure ist hier nur als ein katalytisches Reagens aufzufassen, dessen Wirkungsweise durch intermediäre Reaktionen nach Ostwald oder nach Nef zu erklären ist. Die Tatsache, daß bei solchen hydrolytischen Spaltungen die Anlagerung des Wassers in der Weise stattfindet, daß das eine Spaltungsprodukt den Sauerstoff, das andere den Wasserstoff desselben aufnimmt, ändert nichts an dieser Anschauungsweise.

Das praktische Resultat dieser Betrachtungsweise ist, daß bei Kjeldahlschen Stickstoffbestimmungen in den oben-erwähnten einfachen Verbindungen und mehreren anderen der Zusatz von Kaliumpermanganat auch in Lösung, wie Malfatti vorschreibt, als unnötig, wenn auch nicht als schädlich betrachtet werden muß. Dies entspricht nun meinen Erfahrungen, wenigstens soweit es sich um Harnstoff, Kreatin, Kreatinin und Harnsäure handelt.

Anders verhält es sich mit Malfattis Überlegungen bezüglich der Anwesenheit wenigstens minimaler Mengen Wassers bei Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl. Über die Notwendigkeit desselben stimme ich mit ihm vollkommen überein — ohne Wasser keine hydrolytischen Spaltungen. Nun enthält ja 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure wohl immer genügende Mengen Wasser, um die in 100—200 mg vorhandenen Amido- oder Imidogruppen als Ammoniak abspalten zu können. Nichtsdestoweniger habe ich es zweckmäßig gefunden, bei den oben-erwähnten Verbindungen etwas Wasser oder noch besser wasserhaltige Kristalle hinzuzufügen.

In den folgenden mit Kreatinin ausgeführten Stickstoffbestimmungen wurden abgewogene Mengen mit 20 ccm H_2SO_4 unter Zusatz von 2 g eines Sulfatgemisches (10% Kupfersulfat und 90% Kaliumsulfat enthaltend) erhitzt. Dieses Salzgemisch

wurde darum gebraucht, weil es vorzügliche Dienste bei der Stickstoffbestimmung im Harn gegeben hatte. Daneben wurden öfters 5 ccm Wasser zugesetzt. Bessere Resultate lieferte aber der Zusatz von 5 g kristallisierten Dinatriumphosphates. Dieses Salz wird natürlich durch die Schwefelsäure in Sulfat und freie Phosphorsäure zersetzt, aber das Natriumsulfat ist auch geneigt, Kristallwasser zurückzuhalten, und die entstandene Phosphorsäure muß wohl durch Umwandlung in Pyrophosphorsäure oder Metaphosphorsäuren mehr oder weniger Wasser abgeben.

Theoretisch ist der Prozentgehalt an Stickstoff im Kreatinin **37,21%**.

Nr. 1. 0,17425 g Kreatinin + etwa 1 g Quecksilber + 5 ccm H_2O + 20 ccm Schwefelsäure. Kochdauer 2 Stunden.

Erhalten wurde 46 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,96%** N_2 .

Nr. 2. 0,2209 g Kreatinin + 2 g Sulfatgemisch + 5 ccm H_2O + 20 ccm H_2SO_4 . Kochdauer 1 Stunde. Nach dem Erkalten wurden einige Kubikzentimeter $KMnO_4$ -Lösung (nach Malfatti) zugesetzt und das Kochen nach 20 Minuten wiederholt.

Erhalten wurden 58,2 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,88%** N_2 .

Nr. 3. 0,1592 g Kreatinin + 2 g Sulfatgemisch + 20 ccm H_2SO_4 (kein Zusatz von Wasser). Kochdauer 50 Minuten.

Erhalten wurden 41,9 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,84%** N_2 .

Nr. 4. 0,1499 g Kreatinin genau wie in Nr. 3.

Erhalten wurden 38,75 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,2%** N_2 .

Nr. 5. 0,1956 g Kreatinin wie in Nr. 3 und 4. Kochdauer 1 Stunde.

Erhalten wurden 51,2 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,65%** N_2 .

Nr. 6. 0,1477 g Kreatinin + 2 g Sulfatgemisch + 5 ccm H_2O + 20 ccm H_2SO_4 . Kochdauer $1\frac{1}{4}$ Stunde.

Erhalten wurden 39 ccm $\frac{n}{10} NH_3$, entsprechend **36,97%** N_2 .

Nr. 7. 0,1512 g Kreatinin (wie in Nr. 6). Kochdauer aber nur 20 Minuten.

Erhalten wurden 39,65 ccm $NH_3 = 36,71% N_2 .$

Nr. 8. 0,2335 g Kreatinin + 2 g Sulfatgemisch + 5 ccm H_2O + 5 g Natriumphosphat + 20 ccm H_2SO_4 . Kochdauer 50 Minuten.

Erhalten wurden 61,55 ccm $\frac{n}{10} NH_3 = 36,99% N_2 .$

Nr. 9. 0,1332 g Kreatinin wie Nr. 8 behandelt. Kochdauer 50 Minuten.

Erhalten wurden 35,2 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 37,0\%$ N_2 .

Nr. 10. 0,1554 g Kreatinin, genau wie Nr. 8 behandelt.

Erhalten wurden 40,9 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 36,85\%$ N_2 .

Nr. 11. 0,1594 g Kreatinin. Behandlung dieselbe.

Erhalten wurden 42 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 36,9\%$ N_2 .

Nr. 12. 0,125 g Kreatinin. Behandlung dieselbe.

Erhalten wurden 33,2 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 37,18\%$ N_2 .

Nr. 13. 0,1371 g Kreatinin. Behandlung dieselbe.

Erhalten wurden 36,2 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 37,1\%$ N_2 .

Nr. 14. 0,1249 g Kreatinin. Behandlung dieselbe.

Erhalten wurden 33,1 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 37,1\%$ N_2 .

Nr. 15. 0,1332 g Kreatinin. Behandlung dieselbe.

Erhalten wurden 35,3 ccm n_{10} $\text{NH}_3 = 37,1\%$ N_2 .