

Über den Donathschen Nachweis von Cholin in Fällen von Epilepsie.

Von
G. Mansfeld.

Mit sieben Abbildungen auf drei Tafeln.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Königl. ungar. Universität zu Budapest.
Direktor: Prof. Dr. Á. v. Bókay.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. Juni 1904.)

Im Verlaufe von experimentellen Studien über Cholin, die ich derzeit noch nicht zum Abschluß gebracht habe, kam ich des öfteren in die Lage, Cholin im Urin nachweisen zu sollen. Da dieser Nachweis laut Gumbrechts¹⁾ Untersuchungen mit großen Schwierigkeiten verbunden und dennoch nicht mit Bestimmtheit zu führen ist, kam mir eine vor kurzem publizierte Arbeit von Donath²⁾ gelegen, als es genanntem Autor gelungen sein sollte, das Cholin sowohl in der Cerebrospinalflüssigkeit als auch im Urin mit absoluter Sicherheit nachzuweisen.

Es sei mir gestattet, in folgendem zu zeigen, daß hiervon nicht die Rede sein könne, daß vielmehr der vermeintliche Nachweis von Cholin auf einem Irrtum beruht.

Donaths Vorschrift lautet wie folgt:

I. In der Cerebrospinalflüssigkeit: Die steril aufgefangene Flüssigkeit wird mit wenig verdünnter Salzsäure versetzt und am Wasserbad zur Trockene verdunstet. «Der Rückstand wird — und davon hängt das tadellose Gelingen der Untersuchung ab — mit vollständig wasserfreiem Alkohol erschöpft. In den absoluten Alkohol gehen das neben dem

¹⁾ F. Gumprecht, Cholin in der norm. u. path. Spinalflüssigkeit und die physiolog. Funktion derselben (Verh. d. Kongresses für innere Medizin, Wiesbaden, 1900).

²⁾ Julius Donath, Das Vorkommen und die Bedeutung des Cholins in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Epilepsie und organischen Erkrankungen des Nervensystems, nebst weiteren Beiträgen zur Chemie derselben, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, Heft 6, S. 526, 1903.

NaCl stets vorhandene KCl, sowie das — wie ich fand — fast nie fehlende $(H_4N)Cl$ nicht über, sondern nur das salzsaure Cholin, frei von jeder Beimengung von Chloralkalien.» Durch Versetzen mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid entsteht in diesem alkoholischen Extrakt ein Niederschlag, der laut Donath ausschließlich aus Cholinplatinchlorid bestehen und als solches auf Grund zweier charakteristischer Eigenschaften zu identifizieren sein soll: 1. durch seine Löslichkeit in kaltem Wasser, im Gegensatz zu dem schwer löslichen Kalium- und Ammoniumplatinchlorid; 2. durch seine charakteristischen Mikrokristalle.

II. Für den Nachweis von Cholin im Urin lautet die Vorschrift folgendermaßen: «Der mit etwas Salzsäure angesäuerte Harn wird zur Trockene eingedampft, mit absolutem Alkohol ausgezogen, filtriert, wieder eingedampft, in Wasser aufgenommen, mit Salzsäure und wässriger 10%iger Phosphorwolframsäure gänzlich gefällt, wobei gewöhnlich eine grünlichviolette Färbung entsteht. Dieser Niederschlag wird auf dem Filter mit salzsäurehaltigem Wasser gewaschen, hierauf der Niederschlag in ein hohes Becherglas gespült und mit fein pulverisiertem Barythydrat behandelt. Nach kurzer Zeit wird dieses Gemenge abfiltriert und das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt. Hierauf wird wieder filtriert und zur Trockene eingedampft, wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen und schließlich mit alkoholischem $PtCl_4$ gefällt.»

Einige Tropfen der wässrigen Lösung dieses Niederschlages, auf einem Objektträger eingetrocknet, sollen die folgenden mannigfachen Kristallformen zeigen: «Sägeförmig gezähnte Kristallgestalten in Form von Lanzenspitzen, Blatt-, Kreuz- oder Rosettenform, letztere drei- oder vierblättrig — mitunter auch strahlen- oder garbenförmig geordnete Nadeln, scharf abgeschnittene Prismen oder auch sechsseitige rhombische Tafeln. Dieselben sind gelb oder, in sehr dünnen Schichten, wie insbesondere die Nadeln, farblos.»

Donath bezeichnet sein soeben geschildertes Verfahren als sehr genau; mit dessen Hilfe soll ihm der mikroskopische Nachweis von Cholin noch gelungen sein, wenn 100 ccm

normalen menschlichen Harnes nur 2 mg salzsaures Cholin hinzugefügt wurden.

Der Donathsche Nachweis von Cholin muß als richtig anerkannt werden, wenn es sich bewahrheitet, daß

a) die oben erwähnten vielgestaltigen Mikrokristalle in der Tat durch Cholinplatinchlorid gebildet werden, und für diese Verbindung auch wirklich so charakteristisch sind, daß sie von den Kristallformen aller anderen, hier in Betracht kommenden Platindoppelsalze wohl zu unterscheiden sind;

b) daß ferner in das absolut alkoholische Extrakt nicht einmal Spuren von Ammoniaksalzen übergehen, da ja die Mikrokristalle von Ammoniumplatinchlorid von denen des Cholinplatinchlorids bekanntermaßen nur schwer zu unterscheiden sind.

Diese sub a und b angeführten Umstände sind als «*conditio sine qua non*» zu betrachten: sollten sie sich nicht bewahrheiten, so ist das ganze Donathsche Verfahren als unbrauchbar anzusehen.

a) Daß die von Donath abgebildeten Kristallformen nicht nur nicht charakteristisch für das Cholinplatinchlorid, sondern auch gar nicht die des Cholins sind, ergab sich bereits bei meinen ersten Versuchen, die neue Methode auf ihre Brauchbarkeit hin zu prüfen. Ich erhielt nämlich aus dem Harn gesunder Hunde (die niemals Cholin bekommen hatten) mittels Donathschem Verfahrens dieselben Kristallformen, die Donath aus der — angeblich cholinhaltigen — Cerebrospinalflüssigkeit seiner Kranken dargestellt hatte. Zu demselben Resultat kam ich auch weiterhin immer, ob es sich nun um den Urin normaler Hunde oder gesunder Menschen, um die Cerebrospinalflüssigkeit eines an Meningitis tuberculosa leidenden Kindes oder eines getöteten Pferdes gehandelt hatte.¹⁾ (Siehe Fig. 1—6.)

Daß es sich hier nicht um Cholinplatinchlorid handelt, dafür habe ich noch einen anderen positiven Beweis. Aus

¹⁾ Die auf Seite 539 vorkommende Angabe Donaths, daß aus dem Harn eines Hundes, der subkutan 3—7 cg Cholin bekam, die erwähnten Kristallformen nicht zu erhalten waren, erscheint um so befremdlicher, als ich jene Kristalle, wie oben angeführt, aus jedem normalen Menschen- und Hundeharn darstellen konnte!

chemisch reinem Cholinum hydrochloricum (Merck) dargestelltes Platindoppelsalz zeigt nämlich — nach Eintrocknung eines Tropfens der wässerigen Lösung auf einem Objektträger — ganz andere, ziemlich charakteristische, jedoch undeutliche kristallinische Formen. Auch kommt der von Donath im 6. Heft, XXXIX. Band dieser Zeitschrift, reproduzierten Abbildung (Fig. 3) sehr wenig Beweiskraft zu. Zwar ist sie in dieser Publikation einfach «Salzsaures Cholinplatinchlorid, aus reinem synthetischen Cholin» bezeichnet: ich muß jedoch nachdrücklichst betonen, daß dieselbe Abbildung dem ungarischen Originaltext (Magyar orvosi Archivum, Bd. IV, Heft 1) beigefügt, ausdrücklich als «ausgewählten Kristallformen» nachgezeichnet, bezeichnet ist: demnach nicht einem Präparat entspricht. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß solche «Auswahl» nicht statthaft ist, wenn es sich um solch minutiöse Beweisführung, wie auf Grund von Mikrokristallen, handelt.

b) Die Lösung der Frage, welche hier in Betracht kommende Platinverbindung es sein könne, die Donaths Mikrokristalle lieferte, ergibt sich ungezwungen aus der Analyse des zweiten der beiden oben erwähnten Postulata. Donath behauptet, daß in dem von ihm benützten vollkommen wasserfreien Alkohol Cholin allein, frei von jedem Chloralkali, übergeht. Es ist aus Donaths Angaben zwar nicht ersichtlich, ob er die Extraktionen mit wirklich 100%igem Alkohol — dessen Bereitung bekanntlich ein besonders sorgfältiges und umsichtiges Verfahren erheischt — oder aber mit dem käuflichen sogenannten absoluten Alkohol vorgenommen hatte; doch zugegeben, daß Donath die Extraktion in der Tat mit solchem wirklich absoluten Alkohol vorgenommen hatte, erscheint die Behauptung, daß das Extrakt vollkommen frei von Ammoniumsalzen war, immerhin gewagt. Es heißt zwar vom Chlorammonium, daß es in absolutem Alkohol wenig oder kaum löslich sei; jedenfalls bedeutet dies keine Unlöslichkeit, besonders dann nicht, wenn es sich um gleichzeitige Anwesenheit von — dem Urin oder dem Liquor cerebrospinalis entstammenden — organischen Verbindungen handelt, die die Lösbarkeit des Chlorammoniums bedeutend beeinflussen können. Daß diese meine Zweifel genügend ge-

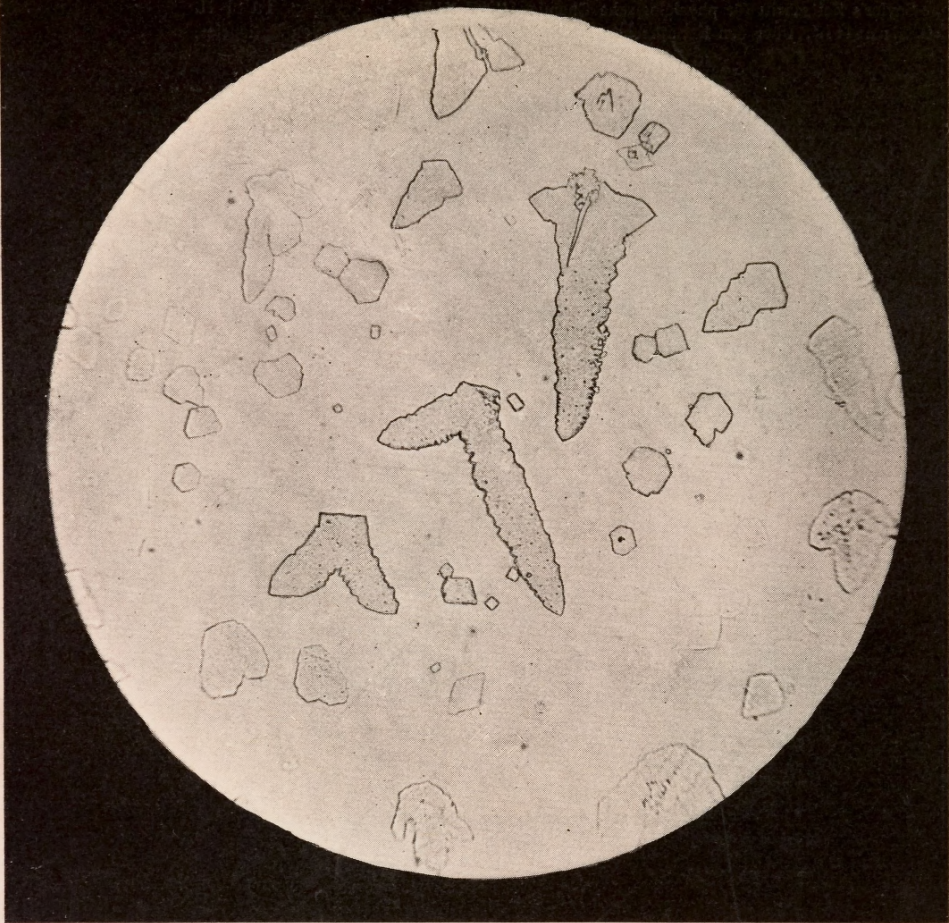


Fig. 1. Aus normalem Hundeharn.



Fig. 2. Aus normalem Hundeharn.

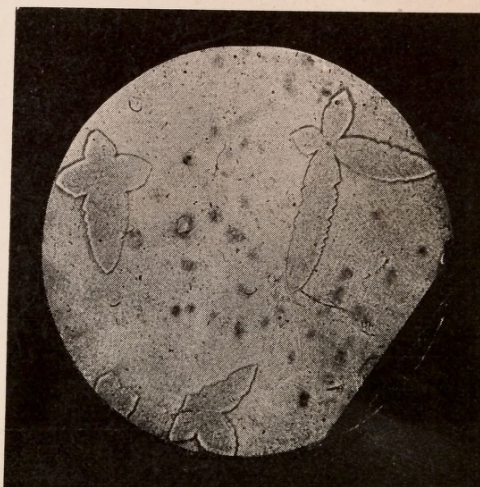


Fig. 3. Aus normalem menschlichen Harn.

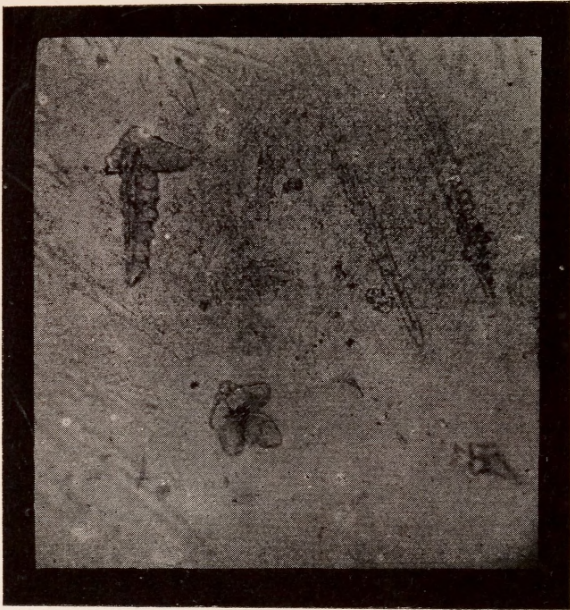


Fig. 4. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines Pferdes.

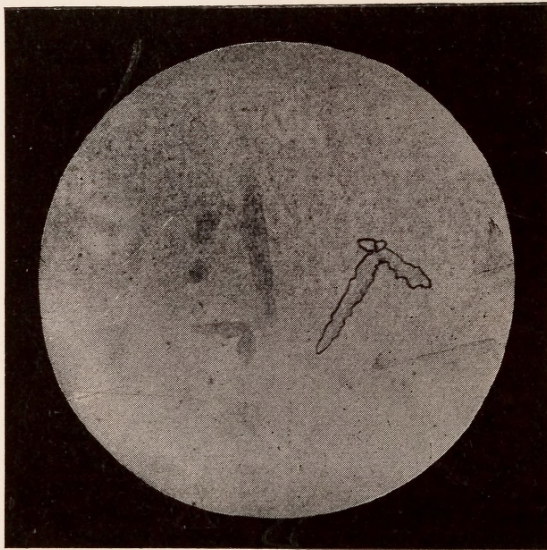


Fig. 5. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines Pferdes.

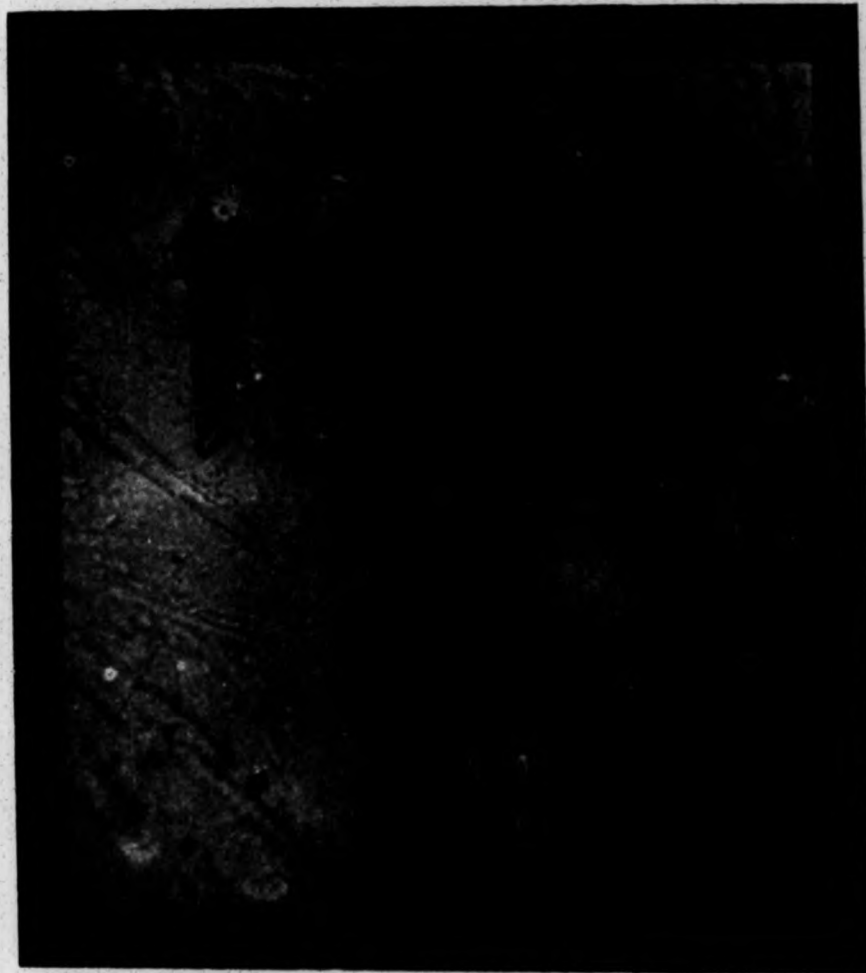


Fig. 4. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines Pferdes.



Fig. 5. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines Pferdes.

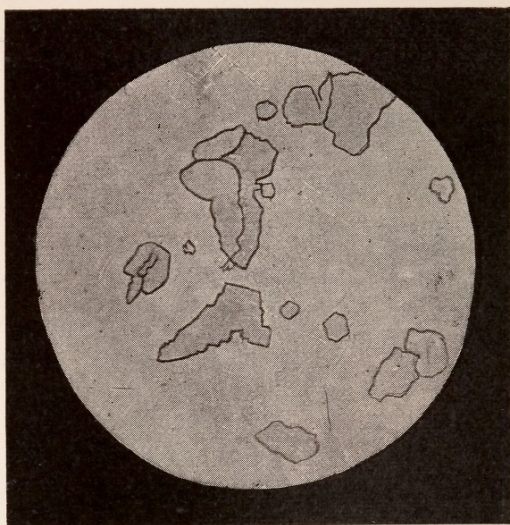


Fig. 6. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines an «Meningitis tuberculosa» leidenden Kindes.

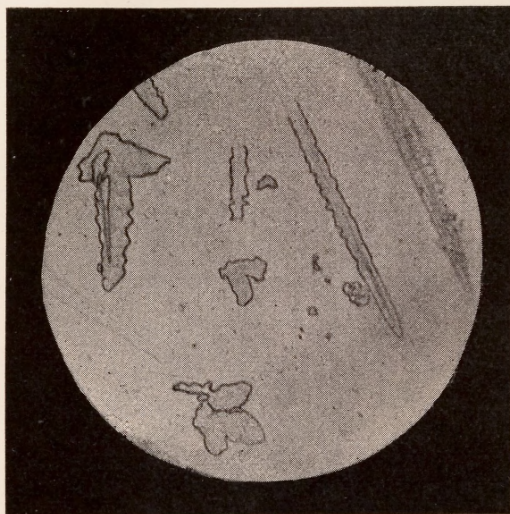


Fig. 7. Ammoniumplatinchlorid.

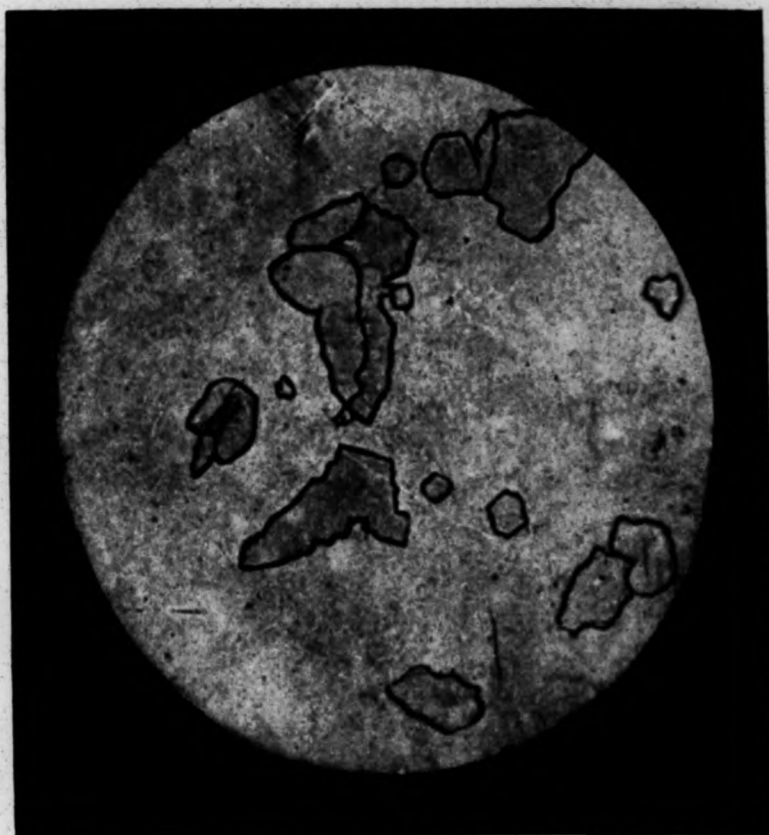


Fig. 6. Aus der Cerebrospinalflüssigkeit eines an Meningitis tuberculosa leidenden Kindes.



Fig. 7. Ammoniumplatinchlorid.

rechtfertigt waren, geht schon daraus hervor, daß Gumprecht¹⁾ unter allen Reaktionen des Cholins, gerade bei der Platinchloridreaktion, das Vorhandensein von Ammoniumsalzen als eine fast unumgehbare Quelle von Irrtümern betrachtet und diese Reaktion nur in dem Falle als beweisend anerkennt, wenn die Anwesenheit von Salmiak vollkommen ausgeschlossen werden kann.

Es ist mir aber auch gelungen, experimentell zu beweisen, daß der faktisch wasserfreie Alkohol selbst das chemisch reine Chlorammonium löst, und daß aus dem Trockenrückstand des Urins beträchtliche Mengen Salmiak in den absoluten Alkohol übergehen.

Den bei meinen Untersuchungen verwendeten Alkohol entwässerte²⁾ ich auf folgende Weise:

Den 98^o/_oigen Alkohol ließ ich mit frisch gebranntem, also kohlenstofffreiem Kalk 3 Tage in einem verschlossenen Gefäße in der Kälte stehen: kochte ihn sodann mittels Rückflußkühler 2 Stunden und destillierte ihn schließlich ab. Der zum Aufsaugen des Destillats bestimmte Kolben wurde mit einem doppeltgebohrten Kork verschlossen. In der einen Bohrung stak das untere Ende des Kühlrohres, in der anderen ein mit zerkleinertem KOH gefülltes Trockenröhrchen. Auf diese Weise ward der wasserfrei gewonnene Alkohol vor dem etwa von außen eindringenden Wasserdampf geschützt und erwies sich, mit dem Alkoholometer bestimmt, stets als 100^o/_oig. Zur größeren Sicherheit stellte ich auch das spezifische Gewicht dieses Alkohols mittels Piknometer fest, dessen Anfüllung bei genau 15.5° C. vor sich ging.

Gewicht des Piknometers:	19.7427 g
Gewicht des Wassers +	124.8430 »
Gewicht des Wassers:	105.1003 g
Gewicht des Piknometers + absoluten Alkohols:	103.3094 g
» » »	19.7427 »
Gewicht des absoluten Alkohols:	83.5667 g
$\frac{83.5667}{105.1003}$	0,795

¹⁾ Gumprecht, l. c.

²⁾ Lassar-Cohn, Arbeitsmethoden für organisch-chemische Laboratorien (Verl. L. Voss, Hamburg u. Leipzig, 1901), Bd. I, S. 110.

Dieses spezifische Gewicht entspricht einem 99,75 vol.-%igen Alkohol. Außerdem überzeugte ich mich vor jedem Einzelversuch, ob der angewendete Alkohol wasserfrei war, und bewerkstelligte die folgenden Extraktionen immer im Exsikkator, damit er auch so bleibe.

Mit dem in oben beschriebener Weise gewonnenen absoluten Alkohol führte ich folgende Versuche aus:

2 g chemisch reinen Chlorammoniums wurden mit 25 ccm absolutem Alkohol eine Stunde lang im Exsikkator in der Kälte extrahiert. Nach Verlauf dieser Zeit wurde der Alkohol in eine vorher abgewogene Schale filtriert, sodann am Wasserbad verdunstet, der, wie es sich herausstellte, beträchtliche Rückstand 12 Stunden lang im Exsikkator getrocknet und schließlich gewogen. Es verblieben in der Schale 0,072 g, d. i. 3,6% der ursprünglichen Quantität des Chlorammoniums.¹⁾

Soviel hatte also der in der Tat 100%ige Alkohol in Lösung gebracht.

Um zu ermitteln, wieviel an Ammoniumsalzen in den absoluten Alkohol übergehen, wenn diese dem Urin entstammen, also auch organische Verbindungen anwesend sind, verfuhr ich folgendermaßen:

Von 200 ccm eines Hundeharns unterzog ich die eine Hälfte der Ammoniakbestimmung nach Schlösing; die andere Hälfte säuerte ich mit Salzsäure an, ließ sie eintrocknen, extrahierte den Rückstand mit absolutem Alkohol, ließ das filtrierte alkoholische Extrakt eindampfen, löste den Rückstand

¹⁾ Als Erwiderung auf meine Bedenken, die ich genau wie in diesen Zeilen im I. Hefte des V. Bandes des «Magyar orvosi Archivum» geltend machte, wendete Donath im «Orvosi Hetilap» (1904, Nr. 11) ein, daß ich zu lange (1 Stunde) extrahiert hätte; mehr als 2—4 Minuten lang dürfte dies nicht geschehen. Zwar hatte es Donath unterlassen, diese Extraktionsdauer in seiner ersten, sowie auch in der deutschen Publikation (Diese Zeitschrift, I. c.) anzugeben; immerhin ließ ich seinen Einwand gelten und wiederholte diese Extraktionsversuche unter den von Donath neuerdings gewünschten Kautelen; kam aber wieder zum selben Resultat: 2 g Salmiak gaben in nur 20 Sekunden 0,065 g, d. i. 3,2% an wirklich absolutem Alkohol ab. — Somit auch dieser Einwand Donaths hinfällig wird.

in Wasser und nahm nun in dieser Lösung wieder die Ammoniakbestimmung nach Schlösing vor.

Diese Bestimmungen ergaben in den ersten 100 cem 5.1 mg Ammoniak, in den zweiten 100 cem (d. h. in der wässerigen Lösung des alkoholischen Extraktes) 3.4 mg. Der absolute Alkohol vermochte demnach 66% des im Urin vorhandenen Ammoniums zu lösen.

Ich darf es nun als erwiesen ansehen, daß auch der absolute Alkohol Ammoniumchlorid in Lösung zu bringen vermag: in geringerem Grade, wenn es in chemisch reinem Zustande vorhanden ist: in ansehnlicher Menge jedoch bei Anwesenheit von organischen Substanzen, die dem Urin und zweifellos auch der Cerebrospinalflüssigkeit entstammen.

Um zu beweisen, daß der absolute Alkohol das Chlorammonium überhaupt nicht zu lösen vermag, stellte Donath folgenden Versuch an: Er fügte zu einer abgewogenen Menge salzsauren Cholins «ein wenig» KCl, NaCl und $(H_4N)Cl$ und fällte das alkoholische Extrakt dieses Gemisches mittels alkoholischer $PtCl_4$ -Lösung.

Das Gewicht des entstandenen Niederschlages entsprach, auf Cholin berechnet, in beiden mitgetheilten Fällen so ziemlich der ursprünglichen Cholinmenge, woraus Donath folgern zu dürfen glaubt, daß eben nur das Cholin in den Alkohol übergegangen war. Auch wenn es sich um abgewogene Mengen von zugesetzten Chloralkalien gehandelt hätte, wäre eine Analyse der Pt-Verbindung auf ihren Pt-Gehalt als dringendes Postulat anzusehen. Geradezu unerläßlich ist aber diese Analyse, wenn die Zutat in «kleinen» Mengen von Chloralkalien erfolgte: es ist durch nichts bewiesen, woraus die Platinverbindung eigentlich bestanden hatte.

Nachdem ich sub a gezeigt habe, daß Donaths Kristallformen für das Cholin nicht im geringsten charakteristisch sind, sub b aber bewiesen habe, daß die Ammoniumsalze, namentlich das $(H_4N)Cl$ selbst in 100%igem Alkohol teilweise löslich sind, wurde ich zu der Annahme gedrängt, daß eben das von dem absoluten Alkohol aufgenommene Chlorammonium es ist, das mit $PtCl_4$ Donaths mannigfaltige Kristallformen bildet.

Um diese meine Annahme auf ihre Richtigkeit zu prüfen, löste ich chemisch reines Chlorammonium in absolutem Alkohol und fällte das Filtrat mit alkoholischer PtCl_4 -Lösung. Der Niederschlag wurde zur Entfernung des überschüssigen Platins wiederholt mit Alkohol gewaschen und schließlich in Wasser gelöst. Einige Tropfen dieser wässrigen Lösung wurden auf dem Objektträger getrocknet. Die unter dem Mikroskop sichtbaren Kristalle erwiesen sich als vollkommen identisch mit denen, welche Donath aus der Cerebrospinalflüssigkeit von Kranken darstellte und für Cholin charakteristisch ansah. (Siehe Fig. 7.)

Es ist wohl wahr, daß, wie Donath angibt, das Ammoniumplatinchlorid in Oktaeder- und Tetraederformen kristallisiert: jedoch nur dann, wenn der Kristallisationsprozeß in gewohnter Weise aus einer größeren Flüssigkeitsmenge allmählich vor sich gehen kann und nicht aus einem Tropfen in kürzester Zeit. Dies gilt aber ebenso auch für das Cholinplatinchlorid; bei normal ausgeführter Kristallisation liefert es, wie Donath selbst anführt, große, schön ausgebildete Formen, am Objektglas dagegen unregelmäßige, schlecht entwickelte Kristalle. Aber selbst in diesen unentwickelten Formationen sind die aus reinem Cholin dargestellten, wie ich es schon oben erwähnte, wohl zu unterscheiden von denjenigen, welche wir aus jedem normalen Harn erhalten.

Ich glaube somit bewiesen zu haben:

1. daß die nach Donaths Vorschrift dargestellten Kristalle für Cholin nicht charakteristisch sind:
2. daß diese Kristalle sich aus jedem normalen Harn und jeder Cerebrospinalflüssigkeit darstellen lassen:
3. daß die Kristalle von Ammoniumplatinchlorid gebildet werden.