

Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins.

Von

M. Jaffe.

(Aus dem Laboratorium für medicin. Chemie zu Königsberg i. Pr.)
(Der Redaktion zugegangen am 26. Juni 1886.)

In der physiolog.-chemischen Literatur finden sich nur sehr spärliche Angaben über das Verhalten normalen Harns auf Zusatz von Pikrinsäure.

In K. B. Hofmann's Lehrbuch der Zoochemie heisst es S. 402: «Fügt man gesättigte Pikrinsäurelösung zu Menschenharn, so bleibt derselbe anfänglich klar, dann setzt sich (nach 3—4 Stunden) ein mässiger, gelbgefärbter, aus Harnsäurekrystallen und feinen Nadeln bestehender Bodensatz ab». H. Beaunis (Nouveaux éléments de Physiologie humaine) sagt S. 776: «l'acide picrique en precipite des cristaux d'acide urique» und H. Huppert in seiner Bearbeitung von Neubauer-Vogel's Analyse des Harns giebt S. 124 an, dass normaler Harn beim Kochen mit Pikrinsäure einen starken flockigen Niederschlag giebt.

Die gelegentliche Verwendung der Pikrinsäure zum Nachweise von Eiweissstoffen war für mich die Veranlassung die Erscheinungen, welche diese Säure in normalem Urin hervorruft, genauer zu verfolgen.

Es ergab sich Folgendes:

Wenn man menschlichen Harn mit conc. wässriger Pikrinsäurelösung versetzt, so bleibt er anfangs klar, scheidet aber im Laufe der nächsten Stunden meistens ein spärliches krystallinisches Sediment ab.

Sehr viel reichlicher und schneller erhält man diesen Niederschlag, wenn man in den Harn fein pulverisirte Pikrinsäure bis nahe zur Sättigung (ca. 1 gr. auf 150 cbcm. Urin) einträgt oder wenn man die Säure in alkoholischer Lösung hinzufügt (für je 100 cbcm. Harn 20 cbcm. einer 5 procentigen Lösung von Pikrinsäure in Alkohol).

Im letzteren Falle deponirt die anfangs klare Mischung bei ruhigem Stehen einen äusserst voluminösen, aus einem Haufwerk von langen gelben Nadeln bestehenden Bodensatz; befördert man die Ausscheidung durch starkes Umrühren, so erscheint der letztere fast momentan, aber in Form eines schweren, nicht makroskopisch-krystallinischen Pulvers. Unter dem Mikroskop zeigt er sich zusammengesetzt aus büschel- oder sternförmig vereinigten Nadeln, zwischen denen gröbere, prismatische oder unregelmässig gestaltete Krystalle von dunklerer Färbung zerstreut liegen.

Zum Zwecke näherer Untersuchung habe ich diesen Niederschlag aus grossen Quantitäten Menschenharn dargestellt und nach dem Trocknen zunächst mit kochendem Wasser in zur völligen Lösung unzureichender Menge behandelt. Auf diese Weise lässt er sich in zwei Antheile zerlegen, einen in Wasser nahezu unlöslichen, der sich als Harnsäure herausstellte, und einen in heissem Wasser löslichen, in gelben Nadeln krystallisirenden Antheil, welcher den bei weitem grösseren Theil des ganzen Niederschlages ausmacht.

I. Die Harnsäure bleibt nach mehrmaligem Auskochen mit Wasser als grau gefärbtes, undeutlich krystallinisches Pulver zurück. Sie hinterliess beim Verbrennen keine Asche, war also nicht an unorganische Basen gebunden. — Indessen ist es mir zweifelhaft, ob die Harnsäure ausschliesslich als freie Säure, ob sie nicht vielleicht zu einem kleineren Theile in leichter löslicher Verbindung durch die Pikrinsäure gefällt wird; es gehen nämlich erhebliche Quantitäten in den heissen wässrigen Auszug über und selbst nach oft wiederholtem Umkrystallisiren aus Wasser oder verdünntem Alkohol gelingt es nur sehr schwer, die in gelben Nadeln krystallisirende Verbindung völlig frei von Harnsäure zu gewinnen.

Da ich mich durch directe Versuche überzeugt habe, dass die Löslichkeit der Harnsäure durch jene Verbindung nicht nennenswerth erhöht wird, so ist anzunehmen, dass sie in dem Pikrinsäure-Niederschlag zum Theil in organischer Verbindung oder, was mir wahrscheinlicher, als unorganisches Salz enthalten ist ¹⁾.

Wie dem auch sei, die Harnsäure des menschlichen Urins wird durch Pikrinsäure nahezu vollständig ausgeschieden, jedenfalls vollständiger, als es bei der gebräuchlichen quantitativen Bestimmung durch Salzsäure geschieht. Die von dem Pikrin-Niederschlag abfiltrirte Flüssigkeit giebt mit ammoniakalischer Silberlösung nur eine minimale Trübung.

Es wurden in mehreren Versuchen die in gleichen Harnquantitäten einerseits durch Pikrinsäure, andererseits durch Salzsäure gewonnenen Harnsäuremengen verglichen und Folgendes gefunden:

1. je 300 cbcm. Harn gaben: mit ClH 0,1125 Harnsäure, mit Pikrinsäure 0,1240 Harnsäure;
2. je 300 cbcm. Harn gaben: mit ClH 0,134 Harnsäure, mit Pikrinsäure 0,145 Harnsäure;
3. je 300 cbcm. Harn gaben: mit ClH 0,178 Harnsäure, mit Pikrinsäure 0,192 Harnsäure.

Die Harnsäurebestimmung in dem Pikrin-Niederschlage geschah folgendermassen: Der letztere wurde abfiltrirt, erst mit wässriger Pikrinsäurelösung, dann mit Alkohol gewaschen und nach oberflächlichem Trocknen an der Luft mit ca. 30 cbcm. Wasser unter Zusatz von 5—10 cbcm. Salzsäure gekocht, die hierdurch getrennte Pikrinsäure nach dem Erkalten durch Aether ausgeschüttelt.

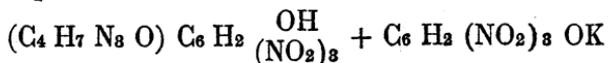
¹⁾ Anmerkung: In der Vermuthung, dass die Harnsäure vielleicht durch Kreatinin gelöst sein könnte, untersuchte ich ihr Verhalten gegen diese Base und überzeugte mich, dass sie mit Kreatinin keine Verbindung eingeht. Wässrige Kreatininlösung nimmt beim Erhitzen kaum mehr Harnsäure auf, wie reines Wasser und wenn man eine Lösung von salzsaurem Kreatinin mit einer Lösung von neutralem harnsaurem Kalium zersetzt, so wird freie Harnsäure abgeschieden.

In der sauren wässrigen Flüssigkeit scheidet sich nach mehreren Stunden die Harnsäure vollständig aus, wird durch ein gewogenes Filter filtrirt und nach dem Auswaschen und Trocknen gewogen.

II. Der in heissem Wasser leicht lösliche Antheil des Pikrinsäure-Niederschlags wird nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus heissem Wasser oder 50procentigem Alkohol in schönen goldgelben Nadeln erhalten. Um ihn völlig frei von Harnsäure zu gewinnen, ist es zweckmässig, ihn noch einmal aus sehr starkem Alkohol, worin er allerdings selbst in der Siedehitze sehr wenig löslich ist, umzukrystallisiren. Noch bequemer wird die Verbindung in reinem Zustande dargestellt, wenn man den ursprünglichen Pikrinsäure-Niederschlag nach dem Trocknen sofort wiederholt mit starkem Alkohol auskocht und die beim Erkalten des Lösungsmittels ausfallende Substanz nunmehr aus dünnem Weingeist umkrystallisirt.

Die Untersuchung der Verbindung lehrte sofort, dass sie ein Pikrat des Kreatinins enthält; indess ergab die Elementaranalyse Zahlen, welche von den einer einfachen Verbindung der Pikrinsäure mit Kreatinin entsprechenden wesentlich abwichen. Andererseits war die Uebereinstimmung der analytischen Werthe unter sich eine so grosse, dass die Annahme eines blossen Gemenges völlig ausgeschlossen werden musste, vielmehr die Ueberzeugung sich aufdrängte, dass eine reine Verbindung von constanter chemischer Zusammensetzung vorlag.

Die naheliegende Vermuthung, dass es sich um ein Doppelsalz handelte, bestätigte sich in der That durch den Nachweis eines constanten Kaliumgehaltes der Verbindung, die sich nunmehr als ein Doppelsalz von pikrinsaurem Kreatinin mit pikrinsaurem Kalium von der Formel:



herausstellte.

Die Eigenschaften dieses Doppelsalzes sind folgende: Es krystallisirt in citronengelben Nadeln oder dünnen Prismen ist in Wasser oder verdünntem Alkohol in der Hitze leicht,

in der Kälte schwer löslich (einige Löslichkeitsbestimmungen s. unten), in kaltem starken Alkohol sehr schwer, in heissem etwas reichlicher löslich, in Aether fast unlöslich.

In trockenem Zustande kann das Salz auf ca. 160° erhitzt werden, ohne sich zu verändern oder an Gewicht zu verlieren, es enthält demnach kein Krystallwasser. Schnell erhitzt explodirt es mit ziemlich heftiger Detonation unter Feuererscheinung (die Explosivität ist aber schwächer als die des Kaliumpikrates).

Analysen.¹⁾

1. 0,286 Substanz bei 110° getrocknet gaben: 0,3343 CO₂ und 0,0660 H₂O, entspr. 31,87% C und 2,56% H;
2. 0,178 Substanz gaben: 0,2082 CO₂ und 0,0395 H₂O, entspr. 31,9% C und 2,46% H;
3. 0,2592 Substanz gaben: 0,3030 CO₂ und 0,0535 H₂O, entspr. 31,9% C und 2,3% H;
4. 0,334 Substanz gaben: 0,3935 CO₂ und 0,074 H₂O, entspr. 32,13% C und 2,46% H;
5. 0,1625 Substanz gaben: 0,190 CO₂ und 0,0376 H₂O, entspr. 31,85% C und 2,57% H;
6. 0,1536 Substanz gaben: 27,6 cbcm. N bei 20° C und 777 Millimeter Hg, entspr. 20,97% N;
7. 0,2316 Substanz gaben: 41,5 cbcm. N bei 18° C und 762,8 Millimeter Hg, entspr. 20,76% N;
8. 0,3146 Substanz gaben: 0,0460 K₂SO₄, entspr. 6,55% K;
9. 0,3010 Substanz gaben: 0,0436 K₂SO₄, entspr. 6,49% K.

Die Formel des Kreatinin-Kaliumpikrates



verlangt:	gefunden:				
	1.	2.	3.	4.	5.
C = 31,52%	31,87	31,9	31,9	32,12	31,85
H = 1,97%	2,56	2,46	2,3	2,46	2,57
N = 20,68%		20,97	20,76		
K = 6,4%		6,55	6,49		

¹⁾ Anmerkung: Die C- und H-Bestimmungen wurden theils (Nr. 1) durch Verbrennen mit chromsauren Blei unter Zusatz von Kaliumbichromat, theils mit CuO im geschlossenen Rohr und nachfolgender Durchleitung von Sauerstoff, die N-Bestimmungen ebenfalls mit CuO nach der Methode von Dumas ausgeführt. Das Kalium wurde als Sulphat durch Abrauchen der Substanz mit reiner conc. Schwefelsäure bestimmt. Zu den Analysen wurde Material verschiedenster Darstellung benützt.

Um die Constitution der Verbindung zu ermitteln, wurde dieselbe folgendermassen behandelt: Sie wurde, wie bereits oben (S. 392) beschrieben, mit einem Gemisch von 1 Theil Salzsäure und 10 Theilen Wasser einige Minuten zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten zur Entfernung der freigewordenen Pikrinsäure so oft mit Aether geschüttelt, als derselbe noch etwas aufnahm. Nach dem Verdunsten des Aethers blieb die Pikrinsäure rein zurück.

Ich erhielt in dieser Weise:

1. aus 0,400 Substanz 0,3014 Pikrinsäure, entspr. 75,35 %;
2. aus 0,535 Substanz 0,3969 Pikrinlösung, entspr. 74,16%.

Die obige Formel verlangt 75,2 % Pikrinsäure.

Die von dem Aether getrennte salzsaure Lösung wurde auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und mehrmals mit heissem Alkohol extrahirt. Der in Alkohol unlösliche Theil war unorganischer Natur und erwies sich als Chlorkalium. Eine Cl-Bestimmung ergab 48,1 % (verl. 47,65 %).

Aus der heissen alkoholischen Lösung schied sich beim Erkalten theils spontan, theils nach Zusatz von Aether eine grosse Menge farbloser Krystalle aus, welche durch eine Chlorbestimmung, ferner durch Umwandlung in die charakteristische Chlorzinkverbindung, sowie durch die Weyl'sche Reaction als salzsaures Kreatinin identificirt wurden.

0,300 Substanz ergaben, mit Ag-Lösung nach Volhard titrirt einen Cl-Gehalt von 23,97% (salzsaures Kreatinin verlangt 23,74 % Cl).

0,4114 Substanz der in bekannter Weise dargestellten Chlorzinkverbindung gaben 0,1023 ZnO¹⁾, entspr. 22,8 % (Chlorzinkkreatinin verlangt 22,4 % ZnO).

Durch diese Untersuchungen ist der Nachweis geführt, dass die durch Pikrinsäure aus menschlichem Harn gefällte, in gelben Nadeln krystallisirende Substanz aus einem Doppelsalz von pikrinsaurem Kreatinin und pikrinsaurem Kalium besteht.

¹⁾ Der Zink wurde nach Fresenius' quantitativer Analyse I. S. 250 ff., zunächst als Schwefelzink gefällt, dann in das Carbonat umgewandelt und durch Glühen des letzteren in ZnO übergeführt.

Die Schwerlöslichkeit der Verbindung in Wasser legte den Gedanken nahe, die Pikrinsäurefällung zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins, eventuell zur gleichzeitigen Bestimmung von Kreatinin und Harnsäure zu benutzen; allein die Versuche, welche in dieser Absicht in meinem Laboratorium ausgeführt worden sind, haben keine befriedigenden Resultate ergeben und mögen deshalb unerwähnt bleiben. Dagegen sei es mir gestattet, hier noch einige Löslichkeitsbestimmungen mitzutheilen, welche im Anschluss an jene Versuche ausgeführt worden sind.

I. Löslichkeit in Wasser.

1. 100 cbcm. Wasser von 19—20° C lösen 0,1816 gr.
2. 100 cbcm. Wasser von 19—20° C lösen 0,175 gr.
3. 100 cbcm. Wasser von 19—20° C lösen 0,1853 gr.

In Mittel lösen also 100 cbcm. Wasser von 19—20° C 0,1806 Kreatinin-Kaliumpikrat.

II. Löslichkeit in verdünntem Alkohol (1 absoluter Alkohol : 5 Wasser).

100 cbcm. lösen bei 15—16° C 0,113 (Mittel aus 2 Versuchen).

Fassen wir die vorstehend mitgetheilten Resultate zusammen, so ergibt sich, dass aus normalem menschlichen Harn durch Pikrinsäure gefällt wird: 1) Harnsäure und zwar bei weitem vollständiger, als es durch ClH geschieht und 2) ein Doppelsalz aus Kreatinin- und Kaliumpikrat. In sehr geringen Mengen enthält der Niederschlag noch andere Bestandtheile, mit deren Untersuchung ich noch beschäftigt bin; unter Anderm gelang es mir, darin eine schwefelhaltige Verbindung von mercaptanartigem Geruch nachzuweisen, deren Reindarstellung hoffentlich wird möglich sein.

Hundeharn verhält sich in den meisten Fällen auf Zusatz alkoholischer Pikrinsäurelösung dem menschlichen Urin sehr ähnlich, jedoch mit dem Unterschiede, dass die Harnsäure in dem Niederschlage fehlt oder nur in Spuren vorhanden ist. Letzterer ist fast reines Kreatinin-Kaliumpikrat und scheidet sich oft von vornherein in langen gelben Nadeln, in andern Fällen als blättrig-krystallinische, durch Harnpigment stark gefärbte Masse aus. Die Menge des Präcipitats

ist im Hundeharn eine sehr wechselnde; die Fällung scheint hier keine so vollständige zu sein, wie im Urin des Menschen. Es sei noch bemerkt, dass die Kynurensäure des Hundeharns durch Pikrinsäure nicht niedergeschlagen wird. Während aus Lösungen harnsaurer Salze nach Zusatz von Pikrinsäure sich sofort die Harnsäure in schönen farblosen Krystallen ausscheidet, werden die kynurensauren Salze durch Pikrinsäure nicht zerlegt; selbst die sehr lockere Verbindung von Kynurensäure mit Kreatinin, von der alsbald die Rede sein wird, giebt mit Pikrinsäure wohl einen Niederschlag von Kreatininpikrat, aber keine oder nur geringe Ausscheidung von Kynurensäure.

Es sei mir zum Schluss gestattet, über einige von mir dargestellte, bisher noch nicht beschriebene Verbindungen des Kreatinins, sowie über eine neue, sehr empfindliche Reaction dieser Substanz zu berichten.

Pikrinsaures Kreatinin.



Wenn man eine selbst verdünnte Lösung von reinem Kreatinin mit wässriger Pikrinsäure versetzt, so erstarrt sie sofort zu einem Brei von Krystallen, die nach Umkrystallisiren aus heissem Wasser in langen, sehr dünnen, hellgelben seidenglänzenden Nadeln anschiessen. Die Verbindung ist frei von Krystallwasser, verpufft beim Erhitzen und giebt bei der Analyse Zahlen, welche mit obiger Formel gut übereinstimmen.

1. 0,2743 Substanz bei 110° getrocknet gaben 0,3566 CO₂ und 0,875 H₂O, entspr. 35,42% C und 3,54% H;
2. 0,1832 Substanz bei 110° getrocknet gaben 38,0 chem. N bei 16° C und 771 Millimeter Hg, entspr. 24,52% N.

Verlangt:
C = 35,09
H = 2,92
N = 24,56

Gefunden:
C = 35,42,
H = 3,54
N = 24,52

Das Kreatininpikrat ist in seinem Aussehen dem oben beschriebenen Doppelsalz sehr ähnlich, scheint aber in Wasser etwas leichter löslich zu sein wie jenes.

Kynurensaures Kreatinin.

Trägt man gepulverte Kynurensäure in eine heisse verdünnte Lösung von reinem Kreatinin, worin sie sich reichlich auflöst, so krystallisirt die Verbindung beim Erkalten der filtrirten Lösung in Büscheln von farblosen dünnen Prismen aus. Dieselben sind in Wasser leicht löslich, lassen sich aber nicht umkrystallisiren, weil sie durch Wasser allmählig schon in der Kälte, sofort beim Erhitzen unter Abscheidung von Kynurensäure zerlegt werden.

Es war daher nicht möglich, die Verbindung in analysenreinem Zustande zu erhalten und beschränkte ich mich deshalb auf eine Bestimmung der darin enthaltenen Kynurensäuremenge, wobei ebenfalls nur annähernde Werthe resultirten.

Die Bestimmung geschah in der Weise, dass das Salz mit sehr verdünnter Salzsäure erwärmt, nach mehrstündigem Stehen die Kynurensäure auf einem Filter gesammelt und gewogen wurde.

0,4811 kynurensaures Kreatinin über Schwefelsäure getrocknet gaben 0,2922 Kynurensäure, entspr. 60,7 % (verlangt 62,57%).

Eine neue Reaction auf Kreatinin.

Versetzt man eine Lösung von Kreatinin mit etwas wässriger Pikrinsäurelösung und einigen Tropfen verdünnter Kali- und Natronlauge, so färbt sie sich sofort und zwar schon in der Kälte intensiv roth. Die Intensität der Farbe, die je nach der Concentration der Lösung von rothorange bis dunkelblutroth varirt, nimmt in einigen Minuten noch erheblich zu und bleibt stundenlang unverändert; nur wenn ein Ueberschuss von Alkalilauge angewendet war, wird die Lösung, zumal dem Lichte ausgesetzt, nach einiger Zeit gelb. Ansäuern mit Essigsäure oder Salzsäure wandelt die rothe Farbe in wenigen Minuten in gelb um.

Diese Reaction giebt an Empfindlichkeit der Weyl'schen nichts nach; noch bei einer Verdünnung von 1 : 5000 nimmt das Kreatinin einen röthlichen Farbenton an, der von der schwach orangegelben Färbung des pikrinsauren Kaliums auf das deutlichste unterschieden ist. Bedient man sich zur Hervorrufung der Reaction ausschliesslich der Natronlauge, so ist vollends jede Verwechslung ausgeschlossen, weil die Farbe des Natriumpikrates eine rein gelbe ist.

Kreatin, selbst in concentrirter Lösung giebt mit Pikrinsäure und Alkalien rein gelbe Färbung, die erst nach längerem Stehen in der Kälte in roth übergeht. Ebenso wenig giebt irgend ein anderer der bekannten Harnbestandtheile (Harnstoff, Harnsäure u. s. w.) die für das Kreatinin charakteristische Pikrinsäurereaction. Selbst der Traubenzucker giebt sie bei gewöhnlicher Temperatur nicht oder jedenfalls erst nach langem Stehen, während allerdings beim Erwärmen sofort die bekannte blutrothe, auf Reduction der Pikrinsäure beruhende Farbe auftritt. Es ist daher ein entschiedener Irrthum, wenn, wie es in verschiedenen Schriften ¹⁾ geschieht, eine durch Pikrinsäure in alkalischer Lösung hervorgerufene Rothfärbung als charakteristische Reaction des Traubenzuckers angeführt wird. Es dürfte wenigstens der Zusatz, dass diese Färbung nur beim Erwärmen auftritt, nicht vergessen werden. Bei erhöhter Temperatur wird aber die Pikrinsäure durch viele andere Substanzen, z. B. durch Harnsäure unter Rothfärbung reducirt.

Einzig und allein das Aceton zeigt auf Zusatz der genannten Reagentien in der Kälte eine schwach röthlichgelbe Nüance, die indess mit der viel intensiveren und rein rothen Farbe des Kreatinins nicht verwechselt werden kann.

Im Urin des Menschen, des Hundes und Kaninchens lässt sich die Anwesenheit des Kreatinins durch die neue Reaction, ebenso wie durch die von Weyl ohne Weiteres nachweisen.

¹⁾ Z. B. in der eben erschienenen 2. Auflage des Penzold'schen Schriftchens über ältere und neuere Harnproben.