

XXVII.

Ueber die Anwendbarkeit der Methode zur Harnstoffbestimmung von Bunsen für das Blut.

Von Dr. Treskin aus Mstislawl (Russland).

Aus dem Laboratorium des Herrn Prof. F. Hoppe-Seyler.

Wenn man die zahlreichen Arbeiten durchgeht, welche seit den Untersuchungen von Dumas und Prevost ¹⁾ über den Gehalt des Blutes und verschiedener Organe an Harnstoff veröffentlicht sind, kann es zunächst scheinen, als sei man nicht allein bereits in den Besitz ausreichender Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs in Blut, Secreten und Parenchymflüssigkeiten gelangt, sondern habe auch schon vermittelt derselben tiefere Einblicke in die Bildung des Harnstoffs aus den stickstoffhaltigen Bestandtheilen des Körpers vermittelt der ausgeführten Bestimmungen gewonnen, eine etwas eingehendere Kritik lässt jedoch bei allen benutzten Methoden und daher auch in den erhaltenen Resultaten erhebliche Mängel erkennen und bei experimenteller Prüfung der angewendeten Prozeduren ergiebt sich die ausserordentlich geringe Zuverlässigkeit der erhaltenen Resultate.

Es hat natürlich keine besondere Schwierigkeit, den Harnstoff von den Eiweissstoffen zu trennen, mag man diese Trennung durch Alkohol oder durch Kochen der mit Wasser verdünnten Substanzen nach schwachem Ansäuern ausführen, durch Anwendung von absolutem Alkohol nöthigenfalls unter Zufügen von etwas Aether, ist man im Stande, die meisten Verunreinigungen zu entfernen, da sich der Harnstoff in dieser Flüssigkeit sehr leicht löst, während nur wenige andere bekannte Körper, die hier in Betracht kommen können, diese Eigenschaft mit ihm theilen. Da ferner der Harnstoff in wasserfreiem Aether nicht gelöst wird, ist man auch im Stande, die Fette vollständig zu entfernen nebst Cholesterin und

¹⁾ Annal. de chem. et phys. Tom. XXIII. p. 90. 1823.

Lecithin, dennoch bleiben nachweisbar eine nicht unbedeutende Quantität anderer Körper von Harnstoff noch ungetrennt und die Schwierigkeiten für die Bestimmung des Harnstoffs beginnen erst hier.

Ehe Liebig zum Zweck der Harnstoffbestimmung im Harne die Anwendung des salpetersauren Quecksilberoxyds empfahl, hatte man nach dem Vorgange von Dumas und Prevost ¹⁾ sich hauptsächlich oder eigentlich ausschliesslich der Salpetersäure zur Ausfällung des Harnstoffs bedient, Heintz hatte aber bereits nachgewiesen, dass die Löslichkeit des salpetersauren Harnstoffs in Salpetersäure nicht so unbedeutend ist, als man angenommen hatte, und da man in sehr concentrirter Lösung die Fällung durch Salpetersäure vornehmen musste, konnte auch die Krystallisation salpetersaurer Alkalisalze nicht mit Sicherheit vermieden werden. Beim Trocknen der ausgepressten von Salpetersäure noch feuchten Substanz bei höherer Temperatur musste ein Theil des salpetersauren Harnstoffs zerstört werden. Irgend genaue Resultate konnten somit weder von Dumas und Prevost, noch von Stannius, noch von Anderen, die sich dieser Abscheidungsmethode bedient haben, auch abgesehen von manchen Mängeln der vorbereitenden Proceduren, die dieselben benutzten, erhalten werden.

Nach der Methode von Heintz und Ragsky ²⁾ scheint Niemand versucht zu haben, Bestimmungen von Harnstoff im Rückstande des Alkoholauszugs vom Blute durch Erhitzen mit concentrirter Schwefelsäure und Bestimmung des gebildeten Ammoniaks auszuführen.

Mit dem Erscheinen der Liebig'schen Methode der Fällung des Harnstoffs durch salpetersaures Quecksilberoxyd schien auch für die Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Blute und den Organen ein zuverlässiges Verfahren gegeben zu sein. Mehrere französische Chemiker benutzten dasselbe alsbald für diesen Zweck, Wurtz ³⁾, ebenso Poiseuille und Gobley ⁴⁾ führten mit dieser Methode mehrere Bestimmungen aus, die sich eines nicht geringen Vertrauens erfreuen; obwohl die Art des Operirens von denselben

¹⁾ Ebendasselbst.

²⁾ Handbuch der phys. und pathol. chem. Anal. von F. Hoppe-Seyler. 1870. S. 272.

³⁾ Compts rendus 49 tom. p. 59. 1859.

⁴⁾ Ebendasselbst p. 164.

gar nicht beschrieben ist. Sorgfältiger verfuhr hierin Picard ¹⁾, welcher ausführlich die Methode, die er angewendet, beschrieben hat. Picard wendet nach der Behandlung des Blutes mit Alkohol und einigen Tropfen Essigsäure zur Entfernung anderer Stoffe noch essigsames Blei an, entfernt nach der Fällung und Filtration aus dem Filtrate den Bleiüberschuss durch Schwefelwasserstoff, fällt dann die von Schwefelwasserstoff durch Abdampfen befreite Flüssigkeit mit salpetersaurem Quecksilberoxyd, zersetzt diesen Niederschlag durch Schwefelwasserstoff und dampft die abfiltrirte Lösung zur Trockne ein.

Diese Methode musste fast vorwurfsfrei erscheinen, so lange man nicht wusste, dass auch viele andere Stoffe neben Harnstoff (und Ammoniak) durch salpetersaures Quecksilberoxyd gefällt werden. Versuche von v. Recklinghausen ²⁾ zur Prüfung dieser Methode unternommen, ergaben jedoch schon schlechte Resultate, es fand sich salpetersaures Natron und salpetersaures Ammoniak neben oder statt salpetersaurem Harnstoff. Später hat Meissner ³⁾ die Verwendbarkeit des salpetersauren Quecksilberoxyds dadurch zu verbessern gesucht, dass er zunächst eine Fällung mit diesem Reagens ausführte, in der bereits sauren wässerigen Lösung ohne zu neutralisiren. Der voluminöse entstehende Niederschlag enthält nach ihm keinen Harnstoff, entfernt aber eine Anzahl von Stoffen, welche nach den älteren Bestimmungen wohl fast allemal zum Gewicht des gefundenen Harnstoffs gerechnet wurden. Nach dem Abfiltriren dieses sauren Quecksilberniederschlags wird dann durch Zusatz von kohlensaurem Natron und Quecksilberlösung der Harnstoff gefällt in derselben Weise, wie dies nach Liebig's Vorschriften bei der Titrirung des Harnstoffs im Harn geschieht. Dieser neutrale Quecksilberniederschlag war rein weiss; abfiltrirt und gut ausgewaschen, wurde er in Wasser vertheilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und so eine verhältnissmässig sehr reine Lösung von Harnstoff gewonnen, aus welcher nach gehörigem Einengen mit concentrirter Salpetersäure die Harnstoffverbindung ganz farblos in den schönsten Krystallisationen ausgefällt werden kann. Meissner legt noch be-

¹⁾ De la présence de l'urée dans le sang etc. Strassburg 1856.

²⁾ Dies. Archiv Bd. XIV. S. 476. 1859.

³⁾ Henle und Pfeuffer's Zeitschr. Bd. XXXV. Heft 3. S. 236.

sonderes Gewicht darauf, dass bei der Bestimmung des Harnstoffs in der Leber nach seiner Methode der Zucker abgetrennt wird.

Dass man bei genauer Befolgung der Vorschriften von Meissner nicht hoffen darf, eine genaue Bestimmung des Harnstoffs zu erhalten, ist einfach daraus ersichtlich, dass man bei der Fällung des Harnstoffs nicht wirklich neutralisiren kann, da man sonst in Gefahr käme, sofort gelbes basisches Salz reichlich auszufallen, ferner liegt es in der Methode als nothwendig begründet, dass ein geringer Ueberschuss der Quecksilberlösung zugefügt wird, ausserdem bleibt es noch fraglich, inwieweit die Bildung von Quecksilberchlorid, welche Meissner nicht beachtet zu haben scheint (die Lösung, welche er mit salpetersaurem Quecksilberoxyd fällte, musste etwas Chlormetall enthalten), bei annähernder Neutralisation eine Verunreinigung des Harnstoffs verursacht hat und endlich giebt die farblose reine Krystallisation keine Garantie der chemischen Reinheit der Harnstoffverbindung. Es sind dies nur einige Fragen, die bei der Beurtheilung der Methode sich aufdrängen, bei ihrer Ausführung erweisen sich gleichfalls manche Schwierigkeiten. Gscheidlen ¹⁾, welcher zu einer längeren Reihe von Versuchen die Meissner'sche Bestimmungsmethode benutzt hat, giebt zwar seine Resultate mit grosser Entschiedenheit an, erkennt aber merkwürdigerweise an, dass die glückliche Ausführung der Bestimmung nicht frei von Zufälligkeiten ist. Es kann nicht bezweifelt werden, dass der Harnstoff bei richtiger Ausführung der Procedur ziemlich vollständig durch salpetersaures Quecksilberoxyd gefällt wird, es ist ferner sehr wahrscheinlich, dass bei genügend stark saurer Reaction der Flüssigkeit andere Stoffe durch dieses Reagens entfernt werden können, ohne dass der Harnstoff gefällt wird, aber es ist sehr fraglich, ob durch die Meissner'sche Methode der Harnstoff hinreichend rein erhalten wird, dass man ihn durch Salpetersäure stets isolirt erhalten kann.

Neuerdings hat Gréhant ²⁾ ein früher von Millon ³⁾ zur Bestimmung des Harnstoffs im Harne angewendetes Verfahren in der Weise modificirt, dass er es zur Bestimmung des Harnstoffs in 25 Ccm. Blut benutzen konnte. Den Rückstand des Alkoholauszugs

¹⁾ Studien über den Ursprung des Harnstoffs im Thierkörper. Leipzig 1871.

²⁾ Gréhant, Journ. de l'anat. et de la Physiol. Mai-Juin 1870. p. 318—335.
Virchow und Hirsch Jahresber. 1870. I. S. III.

³⁾ Millon, Comptes rend. T. 26. p. 119.

vom Blute brachte er in Wasser gelöst in den Recipienten der Quecksilberluftpumpe, brachte dann die Millon'sche Lösung von Quecksilber in Salpetersäure hinzu, erwärmte die Mischung, bestimmte die Quantität der entwickelten Kohlensäure und des Stickstoffs und berechnete hieraus die Quantität von Harnstoff, die sich im Blute befand.

Das Verfahren von Millon zur Ermittlung des Harnstoffgehalts im Harne, obwohl sehr schnell ausführbar, ist aufgegeben, weil es unsichere und ungenaue Resultate liefert; die Anwendung, welche Gréhan davon macht, gestattet sowohl die Messung des Stickstoffs als der entwickelten Kohlensäure. Da jedoch alle Amine, Aminosäuren und Amide Stickstoff mit diesem Reagens entwickeln, würde die Messung des Stickstoffs keine zuverlässige Bestimmung des Harnstoffs abgeben können; wie es jedoch kommt, dass Gréhan gleiche Volumina CO_2 und N_2 erhalten hat, ist, wie Prof. Hoppe-Seyler in seinem Referate über die Arbeit Gréhan's hervorhebt, gar nicht ersichtlich, da zwar der Harnstoff bei seiner Oxydation 1 Mol. CO_2 neben 1 Mol. N_2 liefert, aber bei diesem Prozesse aus der salpetrigen Säure noch 1 Mol. N_2 entstehen muss. Da nun sowohl die älteren Erfahrungen bezüglich der Harnstoffbestimmung nach Millon als auch die Angaben von Gréhan manches Unerklärliche und einer genauen Bestimmung Widersprechende zeigen, durch Einwirkung der Salpetersäure aus anderen Substanzen als Harnstoff beim Erwärmen Kohlensäure entwickelt werden kann, würde auch diese Methode eine sichere Stütze für Untersuchungen nicht abgeben können.

Die von Davy¹⁾ angewendete Methode der Harnstoffbestimmung im Harne durch Zerlegung des Harnstoffs mit unterchlorigsaurem Natron, welche bekanntlich stets zu niedrige Resultate liefert, ist von W. Knop und von Hüfner vor Kurzem in der Weise zweckmässig modificirt worden, dass statt des unterchlorigsauren frisch bereitetes unterbromigsaures Natron in concentrirter Lösung in einem Apparate zur Anwendung kommt, in welchem eine hinreichend genaue Messung des entwickelten Stickstoffs ermöglicht ist. Die wenigen analytischen Belege, welche Hüfner angiebt, ergeben jedoch gleichfalls zu niedrige Werthe, ausserdem entwickelte auch Kreatin mit der unterbromigsauren Lauge Stickstoff.

¹⁾ Philos. Magaz. Bd. 7. S. 385.

Bereits im Jahre 1848 hat Bunsen ¹⁾ ein Verfahren zur Bestimmung des Harnstoffs im Harne angegeben, welches recht genaue Resultate giebt, zur Bestimmung des Harnstoffs im Blute war dasselbe noch nicht verwendet, aufgefodert hierzu von Prof. Hoppe-Seyler habe ich die Anwendbarkeit desselben für diesen Zweck geprüft, indem ich zunächst das Blut (defibrinirtes Rindsblut) abgemessen entweder ohne Zusatz oder nach Zusatz einer getrockneten und gewogenen Quantität Harnstoff mit Ueberschuss von gewöhnlichem Alkohol fällte, nach ein paar Stunden die alkoholische Flüssigkeit abfiltrirte, den Rückstand mit Alkohol auswusch und die vereinigten alkoholischen Auszüge auf dem Wasserbade verdunstete. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol ausgezogen, filtrirt und das Filtrat wieder verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und die etwas weisslich trübe Flüssigkeit mit ein wenig basisch-essigsäurem Blei gefällt, nach Entfernung des Bleiniederschlags wurde im Filtrat durch vorsichtigen Schwefelammonium-Zusatz das Blei abgeschieden und die nun abfiltrirte Flüssigkeit nach Bunsen's Vorschrift mit Chlorbaryum und Ammoniak in ein gutes Kaliglasröhrchen eingeschmolzen und einige Stunden auf 180°—220° erhitzt.

Bunsen hat eine noch höhere Temperatur (240°) vorgeschrieben, ich habe mich jedoch überzeugt, dass die angegebenen Temperaturen zur schnellen Zersetzung des Harnstoffs in Kohlensäure und Ammoniak ausreichen. Nach hinreichendem Erkalten aus dem Oelbade genommen zeigten die Röhren als Inhalt eine höchstens sehr schwach gelbliche, meistens farblose Flüssigkeit und einen weissen körnigen Niederschlag. Sie wurden geöffnet, die Flüssigkeit schnell abfiltrirt und mit eben ausgekochtem heissem Wasser der Niederschlag im Rohre und auf dem Filter schnell ausgewaschen. Der kohlensaure Baryt wurde dann in verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung mit Schwefelsäure gefällt und in bekannter Weise der schwefelsaure Baryt bestimmt. Diese Versuche führten zunächst zu folgenden Resultaten:

¹⁾ Annal. d. Chem. und Pharm. Bd. 65.

No. des Versuchs.	Untersuchte Blutquantität in Ccm.	Harnstoff-zusatz.	Erhaltener SO_4Ba	Hieraus berechneter Harnstoff.	Procente Harnstoff im Blute nach Abzug des zugesetzt. Harnst.
I	1. 200	0,06 Grm.	0,343	0,0882 Grm.	0,014 pCt.
	2. 400	—	0,178	0,0458	0,011
II	1. 300	0,09	0,406	0,1045	0,0048
	2. 500	—	0,3005	0,0782	0,0156
III	1. 250	0,06	0,364	0,0937	0,0135
	2. 400	—	0,288	0,0742	0,0186
IV	1. 50	—	0,113	0,0291	0,0582
	2. 100	—	0,156	0,0401	0,0401

In den Versuchen I, III und IV ist die Uebereinstimmung zwischen den beiden Bestimmungen keine grosse, doch sind auch die Differenzen immerhin nur innerhalb der dritten Decimale. Im Versuche II ist die Differenz sehr gross, doch möchte hier ein Fehler in der Bestimmung sich eingeschlichen haben. Die Anwendung des Verfahrens von Bunsen für die Bestimmung des Harnstoffs im Blute kann jedoch nur dann zulässig sein, wenn in den mit Chlorbarium und Ammoniak eingeschlossenen Substanzen keine anderen Stoffe enthalten sind; die bei der Erhitzung mit der alkoholischen Flüssigkeit gleichfalls Kohlensäure liefern. Dass milchsaure Salze die Erhitzung auf und über 200° lange Zeit ohne Zersetzung ertragen, wurde nach mündlicher Mittheilung von Prof. Hoppe-Seyler constatirt; dass ferner Zucker, der ebenso wie Amylum und Cellulose beim Erhitzen mit alkalischen Lösungen, selbst mit Wasser nach Hoppe-Seyler's Versuchen unter reichlicher Kohlensäureentwicklung zersetzt wird, nicht vorhanden war, ergab die völlige oder fast völlige Farblosigkeit der erhitzten Lösung und des Niederschlags von kohlensaurem Baryt. Harnsäure konnte nicht in der Lösung sein; sie liefert gleichfalls reichlich Kohlensäure beim Erhitzen mit Wasser; auch Kreatin ist in absolutem Alkohol hinreichend schwer löslich um hier ausgeschlossen werden zu können, dagegen konnten Stoffe, wie Kreatinin, noch neben Harnstoff in der Lösung enthalten sein. Ich prüfte daher das Verhalten des Kreatins (Kreatinin geht bekanntlich beim Erhitzen mit Alkalilauge in Kreatin über). Wie vorausgesehen war, zersetzte sich dasselbe beim Erhitzen mit Chlorbarium und Ammoniak im Glasrohre auf 200° unter Bildung von Kohlensäure.

- 1) 0,06 Grm. Kreatin gab 0,183 Grm. SO_4Ba entsprechend 0,009425 Grm. C.
- 2) 0,06 - - - 0,178 - - - 0,009167 -

Im 1. Versuche waren 15,708 pCt., im 2. Versuche 15,278 pCt. vom Gewicht des angewendeten Kreatin vom Kohlenstoff in Kohlensäure umgewandelt. Da nun nach der Zusammensetzung $C_4H_5N_3O_2 \cdot H_2O$ das Kreatin 32,215 pCt. C. enthält, so wurde ziemlich genau die Hälfte seines C-Gehaltes in Kohlensäure verwandelt. Es ergibt sich aber hieraus, dass bei der Einwirkung der alkalischen Lösung bei 200° nicht allein das Kreatin in Sarkosin und Harnstoff gespalten und letzterer in Kohlensäure und Ammoniak zersetzt werde, sondern dass auch das Sarkosin einer weiteren Zersetzung unter Kohlensäurebildung unterliegt. Ob im normalen Blute eine für die fraglichen Zwecke beachtenswerthe Quantität von Kreatinin enthalten ist, dürfte sehr fraglich sein, andererseits nehmen Voit und Meissner ¹⁾ an, dass Kreatin und Kreatinin aus der Muskelflüssigkeit durch das Blut unzerlegt in den Harn übergehen und nach zahlreichen Beobachtungen ist es wohl als festgestellt zu betrachten, dass sich diese Körper bei Unterdrückung der Nierenthätigkeit in den Organen also auch im Blute ansammeln. Würde nun auch das oben geschilderte Verfahren zur Bestimmung des Harnstoffs bei weiteren Versuchen als noch brauchbarer sich herausstellen, als es meine Versuche nachgewiesen haben, immerhin müsste erst weiter noch entschieden werden, ob nach Unterdrückung der Harnausscheidung oder bei anderen Affectionen nicht Extractivstoffe im Blute reichlicher sich anhäufen, welche so wie der Harnstoff bei 200° mit ammoniakalischer Chlorbariumlösung kohlensauen Baryt liefern.

Um mich über den Grad der Genauigkeit meiner Anwendung des Verfahrens zu orientiren, behandelte ich auch zwei Portionen von reinem Harnstoff in der angegebenen Weise: 0,06 Grm. Harnstoff gab in dem einen Versuche 0,226 Grm., in dem anderen 0,244 Grm. SO_4Ba , diese Werthe entsprechen 0,0582 und 0,0628 Grm. im Mittel 0,0605 Grm. Harnstoff.

Es würde das Bunsen'sche Verfahren offenbar sich sehr gut mit denen combiniren lassen, in denen der Harnstoff durch Quecksilberlösung gefällt und nach Entfernung des Quecksilbers als salpetersaure Verbindung dargestellt wird.

¹⁾ Henle und Pfeuffer's Zeitschr. Bd. XXXV. Heft 3.