

Zum Nachweis der Harnsäure in den Organen.

Von

Dr. Carl Wulff.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 1. Februar 1893.)

Nachdem Kossel gezeigt, dass die Nucleinbasen aus dem Nuclein entstehen, lag der Gedanke sehr nahe, dass auch die Harnsäure auf gleiche Weise gebildet werde. Schon vor längerer Zeit wurden von Stadthagen¹⁾ Versuche im hiesigen Laboratorium angestellt, um eine evtl. Bildung von Harnsäure aus dem Nuclein experimentell zu beweisen, doch scheiterten die Versuche daran, dass es nicht möglich schien, Harnsäure in geringen Mengen neben dem Xanthin nachzuweisen. Horbaczewski, der sich weiter für diese Frage interessirt hat, glaubt nun durch Digestion von Milzpulpa mit Blut wirklich Harnsäure erhalten und so den experimentellen Beweis der Bildung der Harnsäure aus dem Nuclein erbracht zu haben²⁾.

Allein so sorgfältig und eingehend auch die Versuche von Horbaczewski ausgeführt zu sein scheinen; man kann nicht umhin, einige Einwendungen gegen das erhaltene Resultat geltend zu machen, Einwendungen, die in Anbetracht der weitgehenden Schlussfolgerungen, die sich daraus ergeben, nicht verschwiegen werden dürfen.

Ist das von Horbaczewski isolirte und als Harnsäure angesprochene Product wirklich wesentlich Harnsäure gewesen?

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. 109, S. 390.

²⁾ Monatshefte für Chemie, Bd. 12, S. 221—275.

Das ist die Frage, die sich aufdrängt, um so mehr, als in der Abhandlung Horbaczewski's nicht gesagt wird, ob und wie die Identität der Harnsäure festgestellt wurde. Die Art der Isolirung des als Harnsäure bezeichneten Productes macht es sehr wahrscheinlich, dass dasselbe zum grösseren oder kleineren Theile aus Xanthin bestand.

Auch Kossel gab vor Kurzem in der Sitzung der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 14. Oktober 1892 seinen Zweifeln in dieser Hinsicht Ausdruck.

Im Folgenden werde ich versuchen, vom chemischen Standpunkte aus den Wahrscheinlichkeitsbeweis zu erbringen, dass bei Anwendung von Horbaczewski's Bestimmungsmethode aus den Geweben eine xanthinhaltige Harnsäure erhalten wird. Im Anschlusse hieran werde ich mich über eine von mir ausgearbeitete Methode verbreiten, die eine Trennung der Harnsäure und des Xanthins möglich macht.

Gehen wir zunächst mit besonderer Berücksichtigung des Xanthins die ganze Versuchsanordnung Horbaczewski's durch. Eine Mischung von frischem defibrinirtem Kälberblut wurde in einem Brutofen bei einer Temperatur von $37-40^{\circ}$ 5—8 Stunden digerirt und während dieser Zeit ein langsamer Luftstrom darübergeleitet. Hierauf wurde die Mischung in die vier- bis fünffache Menge einer siedend heissen Kochsalzlösung gegossen, die Flüssigkeit mit Essigsäure angesäuert, aufgeköcht und heiss filtrirt. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit Wasser aufgeköcht, das gemischte Filtrat schliesslich auf 200—300 cbcm. eingedampft und von dem sich gewöhnlich in geringer Menge abscheidenden Niederschlag abfiltrirt. In dieser Lösung, die Horbaczewski weiter zur Isolirung der Harnsäure benutzte, ist nun ohne Zweifel das Xanthin enthalten. In siedendem Wasser löst sich das Xanthin nach den vorhandenen Angaben im Verhältniss von ca. 1:1500; doch kann man wohl als sicher annehmen, dass ein unreines Xanthin, um das es sich in diesem Falle handelt, einen noch höheren Löslichkeitsgrad aufweist. Für andere Körper, z. B. die Harnsäure, liegen in dieser Hinsicht bestimmte Angaben vor, Die 200—300 cbcm. betragende Flüssigkeitsmenge konnte

somit nach geringer Schätzung 0,2 gr. Xanthin enthalten, falls der Gehalt der Pulpa an Xanthin ein so grosser war.

Das weitere Verfahren Horbaczewski's bestand nun darin, dass er die erhaltene Lösung mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesia-Mixtur versetzte, den entstandenen und abfiltrirten Niederschlag nach gutem Auswaschen in der Wärme mit Schwefelnatrium zersetzte und vom Schwefelsilber abfiltrirte. Ebenso wie die Harnsäure geht hierdurch auch das Xanthin in die alkalische Lösung hinein. Letztere wurde dann mit Salzsäure angesäuert, eingedampft, das Abgeschiedene — von Horbaczewski als Harnsäure bezeichnet — hierauf abfiltrirt, mit Wasser, dann mit Alkohol, Schwefelkohlenstoff und Aether gewaschen und getrocknet. Mitunter wurde die Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesia-Mixtur wiederholt.

Gerade dieses Ansäuren der Lösung nun und die folgenden zur Abscheidung der Harnsäure dienenden Manipulationen bilden einen recht kritischen Punkt. Ist die Lösung mit Salzsäure stark oder schwach angesäuert; ist alsbald nach dem Ansäuren abfiltrirt oder aber ist — was wahrscheinlich sein dürfte —, um eine möglichst vollständige Fällung der Harnsäure zu erzielen, mit dem Abfiltriren längere Zeit gewartet worden? Das sind Fragen, die von grösstem Einfluss auf das Resultat sind.

Leider sind die Angaben Horbaczewski's in diesen Punkten nicht detaillirt genug, um daraus mit positiver Bestimmtheit einen Schluss hinsichtlich des Resultates ziehen zu können. Folgende Versuche, die ich mit Xanthin anstellte, ergeben aber, dass das von Horbaczewski als Harnsäure angesprochene Product zum Theil aus Xanthin bestehen konnte.

Löst man Xanthin unter Zusatz von wenig NaOH in Wasser auf und fügt allmählig Salzsäure zu, so entsteht zunächst eine Fällung von Xanthin, die bei eingetretener Neutralität der Flüssigkeit nahezu vollständig ist. Bei weiterem Zusatz von Säure bemerkt man, dass das abgeschiedene Xanthin in der Kälte nur äusserst schwer wieder in Lösung geht. Es

bedarf eines relativ grossen Ueberschusses von Säure, um völlige Lösung herbeizuführen. In der Siedehitze tritt die Lösung zwar leichter ein, doch ist auch hier bei nur schwach sauren Flüssigkeiten u. U. eine völlige Lösung nicht möglich.

Wie schwierig das Xanthin selbst bei starkem Ansäuern von alkalischen Lösungen wieder in Lösung geht, ergeben folgende Versuche:

I. 0,303 gr. Xanthin wurden mit Hülfe von einigen Tropfen Natronlauge in 50 ccm. Wasser gelöst, dann mit Salzsäure übersäuert, so zwar, dass nach erzielter Neutralität noch 5 ccm. Salzsäure (spec. Gew. 1,19) zugefügt wurden: Es trat keine völlige Lösung ein, auch nicht, nachdem die Mischung bis auf 20 ccm. eingedampft war. Die Menge des ungelöst gebliebenen betrug augenscheinlich ca. die Hälfte des angewandten Xanthins.

II. Eine heisse alkalische Xanthinlösung, hergestellt durch Lösen von 0,409 gr. Xanthin und 0,5 NaOH in 60 ccm. Wasser, wurde mit soviel Salzsäure angesäuert, dass nach erfolgter Neutralität noch 5 ccm. Salzsäure (spec. Gew. 1,19) zugegeben wurden. Auch hier trat keine völlige Lösung ein. Auf dem Wasserbade wurde die Mischung bis auf 20 ccm. eingedampft, hierauf noch heiss filtrirt. Das ungelöst Gebliebene, auf gewogenem Filter gesammelt und nach gutem Auswaschen bei 110° getrocknet, betrug 0,18 gr. In dem Filtrate trat beim Erkalten eine weitere Abscheidung ein; nach 12 Stunden war die Menge des weiterhin abgeschiedenen Xanthins so beträchtlich, dass ich sie auf mindestens 0,1 gr. taxirte.

Ich habe bei diesen Versuchen absichtlich einen grossen Ueberschuss von Salzsäure angewandt, um zu zeigen, dass selbst dann die Lösung von Xanthin nicht leicht eintritt. Findet nur ein schwaches Ansäuern der Lösung statt, was vielleicht bei den Versuchen von Horbaczewski der Fall gewesen sein dürfte, so ist naturgemäss die Menge des Xanthins, welche abgeschieden bleibt, eine relativ bedeutend grössere, ja fast die ganze Menge des Xanthins kann ausfallen. Aus Versuch II ergibt sich auch, dass es von nicht unwesentlichem Einfluss für das Resultat ist, wann der entstandene Niederschlag abfiltrirt wird.

Da sich erfahrungsgemäss die Harnsäure, wenn sie aus alkalischer Lösung durch Säuren gefällt wird, erst allmählig abscheidet, so darf wohl angenommen werden, dass Horbaczewski, um eine möglichst vollständige Abscheidung der Harnsäure zu erzielen, mit dem Abfiltriren des Niederschlages einige Zeit gewartet hat. Ist dies nun geschehen, so werden sich mit der Harnsäure noch weiterhin relativ beträchtliche Mengen von Xanthin abgeschieden haben. Die Löslichkeit des Xanthins ist nämlich in der Kälte selbst in stark sauren Lösungen eine äusserst geringe, wie folgende Angaben zeigen:

In Xanthinlösungen, welche enthielten:

10 % HCl u. 2 pro Mille Xanthin	erfolgte Ausscheidung nach 1 Tage,
10 % HCl u. 1,5 » » » » »	» 1½ Tagen,
10 % HCl u. 1 » » » » »	» 3 »

Dem evtl. Einwurf, dass Horbaczewski auch frische Milzpulpa allein in gleicher Weise auf Harnsäure prüfte, aber hieraus meist nur unwägbar Mengen isolirte, dass somit nach dem eingeschlagenen Verfahren kein Xanthin ausgefällt werden kann, begegne ich, indem ich darauf hinweise, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit das Xanthin in der Pulpa sich zum grössten Theil erst durch die Digestion und den dadurch bewirkten grösseren oder geringeren Fäulnisgrad aus dem Nuclein oder dem Guanin bildet (s. a. Schindler, diese Zeitschr., XIII, 441).

Ein zweiter Einwand, der gegen meine Ausführungen erhoben werden könnte, ist der, dass die Löslichkeitsverhältnisse eines unreinen Xanthins, um das es sich bei den Versuchen Horbaczewski's handelt, andere sind, als die eines völlig reinen Xanthins. Das zu meinen Versuchen angewandte Xanthin war ein völlig reines Präparat, welches ich nach der Vorschrift von E. Fischer aus dem Guanin dargestellt hatte. Allerdings hat man allen Grund anzunehmen, wie ich bereits Seite 635 hervorhob, dass der Löslichkeitsgrad eines unreinen Xanthins ein höherer ist, allein die Differenzen werden sich hier doch wohl nur innerhalb enger Grenzen bewegen. Aber selbst bei Annahme eines bedeutend höheren Löslichkeitsgrades des direct aus den Organen erhaltenen, nicht völlig reinen Xanthins erscheint nach meinen Darlegungen eine,

wenn auch nur geringe, Abscheidung von Xanthin bei der Versuchsanordnung von Horbaczewski wahrscheinlich. Da die Mengen der von Horbaczewski isolirten Producte in den einzelnen Fällen nur 0,04—0,143 gr. betragen, so genügt eben schon eine geringe Xanthinabscheidung, um die Richtigkeit der Versuchsergebnisse Horbaczewski's in Frage zu stellen.

Nach den gegebenen Erörterungen muss zumal im Hinblick auf die weitgehenden Schlussfolgerungen, die sich aus den Resultaten der Horbaczewski'schen Versuche ergeben, der Beweis verlangt werden, dass das nach dem eingeschlagenen Verfahren isolirte Product wirklich wesentlich aus Harnsäure bestand. In Anbetracht der nachgewiesenen grossen Wahrscheinlichkeit, dass nach der getroffenen Versuchsanordnung mit der Harnsäure zugleich Xanthin abgeschieden wird, bedarf es in jedem einzelnen Falle der Untersuchung, ob das isolirte Product nur aus Harnsäure besteht, oder ob ein Gemenge von Xanthin und Harnsäure, oder endlich ob vorzugsweise Xanthin vorliegt, dem nur Spuren von Harnsäure beigemischt sind.

Eine für diese Zwecke brauchbare Methode, die den Nachweis von Xanthin neben Harnsäure gestattet, gab es bisher nicht. Eine Kohlenstoff- und Stickstoffbestimmung wird, da Harnsäure und Xanthin nur eine Differenz von 3—4% C und N aufweisen, nicht immer die gewünschte Aufklärung zu geben vermögen, zumal man nach dem Verfahren von Horbaczewski das abgeschiedene Product selbst — sei es nun Harnsäure oder ein Gemenge von Harnsäure und Xanthin — nicht analysenrein erhalten dürfte und ausserdem eine Mischung von Xanthin und Xanthinhydrochlorat dieselben Stickstoffzahlen ergeben kann wie die Harnsäure.

In der Ansicht nun, dass eine Methode Xanthin neben Harnsäure nachzuweisen, bezw. sie zu trennen, für die physiologische Chemie überhaupt von Werth sein muss, habe ich mich mit der Ausarbeitung einer solchen Methode befasst.

Ein charakteristischer Unterschied beider Körper ist das verschiedene Verhalten derselben zu heisser verdünnter Salpetersäure. Während das Xanthin sich gegen verdünnte Salpeter-

säure constant erweist, wird die Harnsäure hierdurch unter Bildung höherer Oxydationsstufen leicht zerstört. Auf diesem unterschiedlichen Verhalten beider Körper beruht die im Folgenden näher zu beschreibende Methode.

Um zunächst qualitativ Xanthin neben Harnsäure nachzuweisen, erwärmt man das vorliegende Product in einem kleinen Becherglase unter häufigem Umschütteln im Wasserbade mit verdünnter Salpetersäure, die auf 100 Theile H_2O 5 Theile HNO_3 (spec. Gew. 1,4) enthält. Die Gegenwart von Harnsäure macht sich alsbald durch die Entwicklung von Gasblasen bemerkbar. Hat diese aufgehört — ein Zeichen, dass die Zerstörung der Harnsäure beendet ist —, so kocht man kurze Zeit auf. Sind grössere Mengen von Xanthin vorhanden, so bleibt infolge der geringen Löslichkeit desselben in stark verdünnter Salpetersäure ein Theil ungelöst, so dass sich schon hierdurch die Gegenwart von Xanthin zu erkennen gibt. Ist die Menge des vorhandenen Xanthins aber gering, so tritt klare Lösung ein. Man macht alsdann die Mischung schwach ammoniakalisch, wobei zuweilen eine von Oxydationsprodukten der Harnsäure herrührende Rothfärbung eintritt, die aber allmählig, schneller beim Erwärmen, unter weiterer Zugabe von Ammoniak wieder verschwindet. Setzt man nun schwach ammoniakalische Silberlösung zu, so macht sich die Gegenwart von Xanthin an der flockenartigen voluminösen Ausscheidung von Xanthinsilber bemerkbar. Da letztere Verbindung in Ammoniak nicht ganz unlöslich ist, so vermeide man einen unnöthigen Ueberschuss. Ein geringer Ueberschuss von Ammoniak ist notwendig, um nicht eventl. durch vorhandene Spuren von Salzsäure eine Fällung resp. Trübung zu erhalten. Salzsäure kann in dem Untersuchungsproduct in dem Falle vorhanden sein, wenn das Xanthin als salzsaures Salz zur Abscheidung gelangte; doch kann es sich dann immer nur um Spuren handeln, da infolge der grossen Neigung der Xanthinsalze zur Dissociation der grösste Theil der Salzsäure durch Auswaschen entfernt wird.

Sind nur äusserst geringe Mengen von Xanthin vorhanden, so erfolgt wegen der geringen Löslichkeit des Xanthin-

silbers in Ammoniak die Abscheidung des Niederschlages erst nach einiger Zeit oder überhaupt nicht. In diesem Fall ist es nothwendig, das Ammoniak durch Salpetersäure nahezu vollständig abzustumpfen oder sogar zu neutralisiren. Eine ausfallende geringe Menge von Chlorsilber wird sich nach einiger Zeit fest zu Boden setzen, und man wird auch dann den gleichzeitig erfolgenden oder nach kurzer Zeit eintretenden voluminösen Niederschlag unschwer als aus Xanthinsilber bestehend erkennen können.

Tritt bei Zusatz der Silberlösung eine Silberreduction ein, die sich u. U. nur durch eine Gelbfärbung der Flüssigkeit zu erkennen gibt, so war die Menge der angewandten verdünnten Salpetersäure nicht ausreichend zur Oxydation der Harnsäure. Zweckmässig wendet man auf 0,1 gr. des Untersuchungsproductes 10 gr. der verdünnten Salpetersäure an.

Nach diesem Verfahren habe ich eine grosse Anzahl von Versuchen angestellt, für welche ich Gemenge von Xanthin und Harnsäure in den verschiedensten Verhältnissen anwandte. Ich führe hier nur einen Versuch an, aus dem hervorgeht, wie empfindlich der Nachweis des Xanthins neben Harnsäure ist:

Angewandt für den Versuch wurden 1 gr. Harnsäure, 0,005 gr. Xanthin und 100 gr. verdünnter Salpetersäure. In der schliesslich erhaltenen ammoniakalischen Flüssigkeit (ca. 120 gr.) trat nach Verlauf einiger Stunden die Fällung von Xanthinsilber mit grossen Deutlichkeit ein. Der Versuch zeigt, dass man nach der angegebenen Methode noch deutlich nachweisen kann, wenn der Harnsäure 0,5% Xanthin beigemischt sind.

Handelt es sich darum, quantitativ die Mengenverhältnisse von Xanthin und Harnsäure zu bestimmen, so kann man in der Weise verfahren, dass man das in möglichst schwach ammoniakalischer Lösung abgeschiedene Xanthinsilber auf gewogenem Filter sammelt und nach gutem Auswaschen und schliesslichem Trocknen bei 120° zur Wägung bringt. Aus der Formel des Xanthinsilbers $C_8H_8N_4O_4Ag_2O$

¹⁾ Ich stütze mich hier auf die Angaben Strecker's, nicht auf eigene Untersuchungen. Annal. d. Chem. u. Pharm., 108, S. 148.

berechnet man die Menge des Xanthins. Man kann auch den Niederschlag mit Filter glühen und aus der restirenden Silbermenge das Xanthin berechnen.

Sind grössere Mengen von Xanthin vorhanden, so empfiehlt es sich, einen andern Weg einzuschlagen. Nachdem man das Untersuchungsproduct in angegebener Weise mit Salpetersäure behandelt hat, macht man die Mischung schwach ammoniakalisch und erwärmt kurze Zeit auf dem Wasserbade.

Das Xanthin geht hierbei gewöhnlich nur zum geringen Theil in Lösung. Man säuert nun mit Essigsäure an und fügt der Mischung das gleiche Volumen Alkohol zu. Nach Verlauf von 12 Stunden hat sich das Xanthin bis auf geringe Mengen, welche gelöst bleiben, abgeschieden, während die Oxydationsproducte der Harnsäure, Ammonium-Nitrat und Acetat in Lösung bleiben. Man sammelt den Niederschlag auf gewogenem Filter, wäscht ihn mit alkoholhaltigem Wasser aus und bringt ihn nach dem Trocknen bei 110° zur Wägung. Aus der so bestimmten Xanthinmenge kann man, wenn vorher das Gewicht von Harnsäure plus Xanthin bestimmt ist, indirect die Menge der Harnsäure berechnen.

Auf Vollkommenheit kann die Methode einen Anspruch nicht machen, doch sind die erhaltenen Resultate hinreichend genau, wie folgende Zahlen darthun:

Angewandt:	Wieder erhalten:
I. Xanthin 0,1545 Harnsäure 0,173	Xanthin: 0,1475.
II. Xanthin 0,2505 Harnsäure 0,286	Xanthin: 0,243
III. Xanthin 0,132 Harnsäure 0,15	Xanthin: 0,126
IV. Xanthin 0,148 Harnsäure 0,172	Xanthin: 0,1425.

Trotz des Zusatzes von Alkohol bleiben also, wie die Versuche zeigen, einige Milligramm Xanthin gelöst (durchschnittlich 0,006 gr. in 100 gr. Flüssigkeit). Es scheint dies daran zu liegen, dass das aus ammoniakalischer Lösung durch

Essigsäure abgeschiedene Xanthin einen höheren Löslichkeitsgrad zeigt¹⁾).

Ich erhielt das Xanthin aus diesen Versuchen völlig rein wieder, wie folgende Stickstoffbestimmung zeigt: In 0,125 gr. des wiedererhaltenen Xanthins wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; verbraucht wurden zur Sättigung des Destillates 32,7 cbcm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$:	Gefunden:
36,84 % N.	36,62 % N.

Die gegebenen Erörterungen verdienen bei der Beurtheilung sämtlicher Angaben über das Vorkommen der Harnsäure in thierischen Geweben berücksichtigt zu werden, da die Salzsäure-Fällung wohl in den meisten Fällen zur Gewinnung der Harnsäure benutzt worden ist.

¹⁾ Es liegen in dieser Hinsicht schon Angaben von Strecker und Scherer vor.
