

Ueber die Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen.

Von

J. Horbaczewski.

(Der Redaction zugegangen am 19. Juli 1893).

Bei dem Nachweise der Harnsäure in den Organen und Flüssigkeiten des Thierkörpers wird man, bei Anwendung der jetzt zur Isolirung der Harnsäure verwendeten Methode, der Fällung mit Silberlösung, kaum in die Lage kommen, ein Product zu erhalten, welches aus reiner Harnsäure bestehen würde — vielmehr wird dasselbe mit einer grösseren oder geringeren Menge der sog. Xanthinbasen, die stete Begleiter der Harnsäure sind, abgeschieden werden. Da das Hypoxanthin und das Kossel'sche Adenin in Säuren und Alkalien ziemlich leicht löslich sind, so ist die Gefahr einer Verunreinigung des als Harnsäure abgeschiedenen Productes mit diesen Basen nicht gegeben, da dieselben bei nachheriger Behandlung der durch Zersetzung des Silberniederschlags erhaltenen Lösung mit Salzsäure (oder Ammoniak) in Lösung bleiben. Anders verhält sich die Sache mit dem Xanthin und Guanin, die weniger leicht löslich sind, als die vorgenannten zwei Basen und die daher unter Umständen, namentlich wenn dieselben in grösserer Menge vorhanden sind, zur Verwechslung oder zur Verunreinigung der Harnsäure führen könnten.

Vor Kurzem haben A. Kossel¹⁾, sowie dessen Schüler Wulff²⁾ den Umstand besonders hervorgehoben, dass beim

¹⁾ Verhandlungen der physiolog. Ges. zu Berlin 1892/93, Nr. 1.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 634.

Nachweise der Harnsäure in den Organen eine besondere Aufmerksamkeit der Trennung der Harnsäure vom Xanthin zugewendet werden müsse, da das isolirte Product mit Xanthin verunreinigt sein könnte. Es ist jedoch klar, dass bei derartigen Versuchen, namentlich wenn ganz frische Organe untersucht werden, nicht nur Xanthin, sondern auch das Guanin in Betracht gezogen werden muss, da man für gewöhnlich kaum in die Lage kommen wird, nur Xanthin allein von der Harnsäure zu trennen, weil auch das Guanin ein steter Begleiter der Harnsäure ist. Nur in denjenigen Fällen, wo die Organe bis zu einem gewissen Grade faulen, wäre blos Xanthin (neben Hypoxanthin), welches aus dem Guanin durch Fäulniss entsteht, zu erwarten.

Eine Methode, welche die Harnsäure von den Xanthinbasen scharf zu trennen gestatten würde, existirt vorläufig nicht. Wulff hat (l. c.) zwar eine Methode ausgearbeitet, nach welcher man das Xanthin von der Harnsäure durch Erwärmen mit verdünnter Salpetersäure trennen kann, wobei die Harnsäure gänzlich zerstört wird, während das Xanthin unverändert bleibt — es ist jedoch einleuchtend, dass dieses Verfahren allein zum Nachweise der Harnsäure nicht angewendet werden kann, weil der Umstand, dass der als Harnsäure angesprochene Niederschlag durch verdünnte Salpetersäure zerstört wird, nicht ausreichend ist, die Identität der Harnsäure festzustellen, da es doch zu gewagt wäre, aus diesem Verhalten allein auf die Anwesenheit von Harnsäure zu schliessen, wenn der als Harnsäure angesprochene Körper auch mit Silberlösung ausgefällt wurde. Das Verfahren von Wulff gestattet jedoch in einfacherer Weise als bisher das Xanthin (neben Harnsäure) nachzuweisen und kann daher mit Vortheil angewendet werden, um den Beweis zu erbringen, dass in einem gegebenen Falle die aus einem Gemische von Harnsäure und Xanthin abgetrennte Harnsäure wirklich völlig xanthinfrei ist, nachdem die Identität derselben durch alle Reactionen sichergestellt wurde. Bevor man jedoch in die Lage kommt, die Reinheit der Harnsäure zu prüfen, muss dieselbe zunächst isolirt werden und eine derartige Methode existirt, wie gesagt, nicht.

I. Trennung der Harnsäure vom Xanthin.

Anlässlich der Discussion der Frage, ob die bei meinen Versuchen über die Harnsäurebildung im Organismus¹⁾ erhaltene Harnsäure Xanthin enthalten haben konnte, welche Vermuthung von Kossel (l. c.), sowie von Wulff (l. c.) ausgesprochen wurde, wurde die Meinung geäußert, dass man gegebenen Falls versuchen könnte, die Harnsäure vom Xanthin entweder mit Salzsäure oder mit Ammoniak zu trennen²⁾.

Einige in dieser Richtung angestellte Versuche ergaben nun, dass nach dem Ammoniak-Verfahren befriedigende Resultate kaum zu erzielen seien, da bei Gegenwart von Xanthin die Löslichkeit des Ammonurats bedeutend zunimmt, so dass man eine bedeutende Einbusse an Harnsäure erleidet. Als Beispiel mögen folgende Bestimmungen dienen:

Es wurden 0,1629 gr. Harnsäure und 0,1612 gr. Xanthin in wenig Lauge gelöst, mit Wasser auf 20 ccm. verdünnt und die heisse Flüssigkeit mit 10 ccm. Salmiaklösung versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde das abgeschiedene Ammonurat abfiltrirt und in der bei der Fokker'schen Methode der Harnsäurebestimmung üblichen Weise in freie Harnsäure umgewandelt. Dabei wurden 0,1375 gr. Harnsäure, d. i. um 0,0257 gr. weniger als die verwendete Menge, gefunden. Als bei einem anderen Versuche nur 0,0296 gr. Harnsäure mit 0,1488 gr. Xanthin in derselben Weise behandelt wurden, hatte sich auch nach 36 St. Stehen kein Ammonurat abgeschieden, sondern die Flüssigkeit blieb klar. Es ergibt sich daraus, dass die Abscheidung der Harnsäure aus Lösungen, die grössere Xanthinmengen enthalten, nach der Fokker'schen Methode nur eine ziemlich unvollständige sein kann und es wäre daher diese Methode in solchen Fällen überhaupt nicht zu verwenden.

Mehrere Versuche, bei denen die Trennung der Harnsäure vom Xanthin mittelst Salzsäure durchgeführt wurde, führten zu besseren Ergebnissen. Es zeigte sich jedoch, dass

¹⁾ Monatshefte f. Chemie, Juli 1889 und April 1891.

²⁾ Du Bois-Reymond's Archiv 1893, S. 101.

auch bei dieser Trennung merkliche Verluste an Harnsäure resultiren, wie z. B. der folgende Versuch lehrt:

0,1619 gr. Harnsäure + 0,1585 gr. Xanthin wurden in wenig Lauge gelöst, die Lösung mit Wasser auf 60 cbcm. verdünnt und kochend heiss mit 5 cbcm. conc. Salzsäure gefällt. Nach 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen wurde filtrirt etc. und es wurden 0,1758 gr. Harnsäure erhalten. Die Menge des Filtrats mit Waschwässern betrug 92 cbcm., die 0,0058 gr. Harnsäure in Lösung halten konnten, — es muss daher die Gesamtmenge der gefundenen Harnsäure zu 0,1516 gr. genommen werden, d. i. um 0,0103 gr. weniger, als die verwendete Menge. Bei anderen in derselben Weise nur mit wechselnden Flüssigkeitsmengen ausgeführten Versuchen wurden ähnliche Resultate erhalten, die in Anbetracht des Umstandes, dass man merkliche Verluste an Harnsäure erleidet, auch nicht ganz befriedigen können.

Aus diesem Grunde wurde noch ein anderes Trennungsmittel und zwar conc. Schwefelsäure versucht. Löst man nämlich das Xanthin in einer genügenden Menge conc. Schwefelsäure und verdünnt die Lösung mit der vierfachen Menge Wasser, so bleibt dieselbe auch nach längerem Stehen klar — es scheidet sich aus derselben kein Xanthin aus, während die Harnsäure bei gleicher Behandlung binnen kurzer Zeit ausfällt. Drei derartige Versuche ergaben folgende Resultate:

1. 0,1472 gr. Harnsäure + 0,1459 gr. Xanthin wurden in 5 cbcm. conc. Schwefelsäure unter gelindem Wärmen gelöst, die Lösung mit 20 cbcm. Wasser versetzt und 19 St. stehen gelassen. Die abgeschiedene Harnsäure wurde mit verdünnter Schwefelsäure, dann mit Wasser und Alkohol gewaschen, wog 0,1504 gr. = + 0,0032 gr.
2. 0,1234 gr. Harnsäure + 0,1304 gr. Xanthin wurden in derselben Weise behandelt, jedoch wurde die Harnsäure schon nach 4 $\frac{1}{2}$ Stunden abfiltrirt. Erhalten wurden 0,1156 gr. = — 0,0078 gr.
3. 0,1222 gr. Harnsäure + 0,1293 gr. Xanthin ebenso behandelt, die Harnsäure nach 5 $\frac{1}{2}$ Stunden filtrirt. Erhalten wurden 0,1208 gr. = — 0,0014 gr.

Diese Beobachtungen ergeben, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach 19stündigem Stehen aus der Lösung sich auch etwas Xanthin mit der Harnsäure ausscheidet, dass

dagegen diese letztere bereits nach 4—5 Stunden abgeschieden ist. Die Prüfung der gewogenen Harnsäure ergab, dass dieselbe im Versuche 1 merkliche Spuren von Xanthin enthielt und ferner dass merkwürdiger Weise die in den Versuchen 2 und 3 erhaltene zwar mit sehr geringen, aber doch nachweisbaren Spuren von Xanthin verunreinigt war. Dieser Umstand war der Grund, dass das ganze Verfahren dahin abgeändert wurde, dass die aus schwefelsaurer Lösung ausgeschiedene Harnsäure noch einmal in Lauge gelöst, die Lösung mit Salzsäure übersättigt, auf ein kleines Volum eingedampft und die erst nun abgeschiedene Harnsäure filtrirt und gewogen wurde. Bei diesem Vorgange erhält man die Harnsäure rein (xanthin-frei) und erleidet keine grösseren Verluste. (Dabei wird auch ein kleiner Missstand vermieden, nämlich dass die aus schwefelsaurer Lösung abgeschiedene Harnsäure in der Regel an die Gefässwände so ankrystallisirt, dass das Entfernen derselben einige Schwierigkeiten bereitet, während das nach Ausscheidung aus der mit Salzsäure angesäuerten Lösung nicht der Fall ist). Es wurde daher bei den folgenden Versuchen wie folgt verfahren: Harnsäure und Xanthin wurden bei 110° C. getrocknet, gewogen, in einem Platinschälchen in reiner conc. Schwefelsäure, von der auf je 0,1 gr. Substanz 2 cbcm. verwendet wurden, unter gelindem Erwärmen gelöst und die Lösung mit der 4fachen Menge Wasser versetzt. Nach fleissigem Rühren, bis sich die Harnsäure reichlich abzuschneiden begann, wurde die Flüssigkeit 3—6 Stunden stehen gelassen. Nachher wurde die ausgeschiedene Harnsäure auf ein ganz kleines Filterchen gebracht, zunächst mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser allein gewaschen, der Niederschlag abermals (in demselben Schälchen, aus welchem demnach die Harnsäure nicht vollständig entfernt werden muss) in wenig reiner Natronlauge (e natrio) gelöst, mit Salzsäure stark angesäuert und auf einige cbcm. verdampft. Nach 1stündigem Stehen wurde durch ein Ludwig'sches Glaswollfilter filtrirt, mit salzsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser, schliesslich mit Alkohol und Aether gewaschen, bei 110° C. getrocknet und gewogen.

In dieser Weise wurden 15 Versuche ausgeführt, deren Resultate in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt sind.

In der Tabelle sind angeführt: Menge der verwendeten Harnsäure und des Xanthins, ferner Menge des Filtrats mit den Waschwässern, die hier nothwendigerweise grösser ausfallen muss und daher merkliche Harnsäuremengen in Lösung hält. Diese in Lösung bleibenden Harnsäuremengen wurden unter Zugrundelegung der Lösungsverhältnisse der Harnsäure 1:16,000 Wasser berechnet und dann als Correctur zu der gewogenen Harnsäure hinzuaddirt. In der letzten Rubrik ist die Differenz zwischen der so gefundenen und verwendeten Harnsäure-Menge angegeben.

Versuchs-No.	Die beim Versuche verwendete Menge von		Verwendete conc. Schwefelsäure cbcm.	Menge des Filtrats sammt Waschwässern cbcm.	Harnsäure.		Gesamt-Harnsäure gr.	Differenz gr.
	Harnsäure	Xanthin			Gewogen.	im Filtrat gelöst (Correctur).		
	gr.	gr.						
1.	0,1210	0,1297	5	77	0,1112	0,0048	0,1160	— 0,0050
2.	0,1174	0,1209	5	68	0,1120	0,0040	0,1160	— 0,0014
3.	0,1265	0,1231	5	68	0,1175	0,0040	0,1215	— 0,0050
4.	0,1211	0,1231	5	57	0,1183	0,0034	0,1217	+ 0,0006
5.	0,1258	0,1231	5	65	0,1170	0,0040	0,1210	— 0,0048
6.	0,0340	0,1249	3	50	0,0268	0,0030	0,0298	— 0,0042
7.	0,0325	0,1186	3	53	0,0244	0,0032	0,0276	— 0,0049
8.	0,0822	0,1141	4	64	0,0753	0,0038	0,0791	— 0,0031
9.	0,0882	0,1236	4	60	0,0806	0,0036	0,0842	— 0,0040
10.	0,1323	0,0273	4	76	0,1272	0,0045	0,1317	— 0,0006
11.	0,1325	0,0407	4	71	0,1263	0,0043	0,1306	— 0,0019
12.	0,1291	0,1180	5	73	0,1200	0,0045	0,1245	— 0,0046
13.	0,1232	0,1252	5	70	0,1141	0,0042	0,1183	— 0,0049
14.	0,1346	0,1167	5	65	0,1265	0,0040	0,1305	— 0,0041
15.	0,1410	0,1321	5	77	0,1342	0,0048	0,1390	— 0,0020

Wie aus den mitgetheilten Resultaten hervorgeht, ist die gefundene Harnsäuremenge, mit Ausnahme des Versuches Nr. 4, der fehlerhaft ist, auch nach Hinzurechnung der Correctur constant etwas kleiner, als die angewandte (die grösste Differenz beträgt 0,0050 gr.).

Es war denkbar, dass dieses kleine Minus dadurch bedingt ist, dass sich in den stark sauren Flüssigkeiten etwas mehr

Harnsäure löst, als im Wasser. Zwei nachfolgende Versuche zeigen jedoch, dass das nicht der Fall ist.

0,1256 gr. Harnsäure wurden in 5 cbcm. conc. Schwefelsäure gelöst, mit 20 cbcm. Wasser versetzt, die abgeschiedene Harnsäure nach 3 St. filtrirt, mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser gewaschen, nachher in Lauge gelöst, mit Salzsäure übersättigt, eingedampft, nach 1 St. filtrirt, mit salzsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und gewogen. Es wurden 0,1220 gr. Harnsäure erhalten. Da die Menge des Filtrats sammt Waschwässern 70 cbcm. betrug, so müssen noch als Correctur 0,0042 gr. hinzuaddirt werden. Es ergeben sich demnach im Ganzen $0,1262 \text{ gr.} = + 0,0006 \text{ gr.}$ Harnsäure.

Beim zweiten, in ganz ähnlicher Weise angestellten Versuche wurden 0,1305 gr. verwendet und 0,1306 gr. (mit Correctur) gefunden $= + 0,0001 \text{ gr.}$

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass auch in ziemlich starken Säuren sich nicht mehr Harnsäure löst, als im Wasser. Es kann demnach der Grund dessen, dass bei den Trennungsversuchen constant etwas weniger Harnsäure gefunden wurde, nur in dem Beisein des Xanthins liegen, welches offenbar die Löslichkeit der Harnsäure in geringem Grade steigert. Es wäre daher bei der Fällung der Harnsäure mit Säure aus Lösungen, die Xanthin enthalten, noch eine Correctur anzubringen, die sich nach den vorstehenden Versuchen für je 100 mgr. Xanthin zu 3,2 mgr. berechnet, die zu der gefundenen Harnsäure hinzuzuaddiren sind. Ist die Xanthinmenge gering, so ist eine solche Correctur überflüssig.

Nach dem mitgetheilten Verfahren erhält man demnach ganz befriedigende Resultate der Trennung der Harnsäure vom Xanthin. Die geringe Menge von Harnsäure, die mit dem Xanthin in Lösung bleibt, genirt dann bei der Xanthinbestimmung nicht viel. Die Silberverbindung des Xanthins, die aus dem ammoniakalisch gemachten Filtrate abgeschieden wird, wird in üblicher Weise mit Salpetersäure behandelt und dabei werden diese Harnsäurespuren sofort zerstört, oder es kann aus dem mit Ammoniak neutralisirten Filtrate das

Xanthin mit Essigsäure abgeschieden und nach Wulff mit verd. Salpetersäure behandelt werden, um die Harnsäure zu zerstören.

Die bei den vorstehenden Versuchen abgeschiedene Harnsäure wurde in jedem einzelnen Falle auf ihre Reinheit, bzw. ob sie nicht Xanthin enthält, geprüft. Mit Ausnahme des Versuchs Nr. 4, bei welchem Spuren von Xanthin nachgewiesen wurden, erwies sich dieselbe bei Anwendung des oben erwähnten Verfahrens von Wulff als rein.

Der Grund, dass die Harnsäure im Versuche Nr. 4 mit Spuren von Xanthin verunreinigt war, liegt darin, dass bei diesem Versuche der Harnsäureniederschlag absichtlich sehr wenig gewaschen wurde. Beim Auswaschen desselben kommt man übrigens mit ziemlich wenig Flüssigkeit aus — wie aus den vorstehenden Angaben hervorgeht — man muss nur beim jedesmaligen Waschen wenig Flüssigkeit anwenden, dasselbe jedoch recht viele Male wiederholen.

II. Trennung der Harnsäure vom Guanin.

Die Trennung der Harnsäure vom Guanin wurde in ganz derselben Weise wie diejenige vom Xanthin durchgeführt. In Betreff der Details der Ausführung wird daher auf das im Vorstehenden Mitgetheilte verwiesen. Die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Versuchs-No.	Die beim Versuche verwendete Menge von		Verwendete conc. Schwefelsäure ebem.	Menge des Filtrats sammt Waschwässern ebem.	Harnsäure		Gesamt-Harnsäure.	Differenz.
	Harnsäure	Guanin.			Gewogen.	im Filtrat gelöst (Correctur).		
	gr.	gr.						
1.	0,1175	0,1058	5	75	0,1140	0,0045	0,1185	+ 0,0010
2.	0,1223	0,1139	5	75	0,1196	0,0045	0,1241	+ 0,0018
3.	0,1138	0,1224	5	60	0,1102	0,0036	0,1138	+ — 0
4.	0,1397	0,0539	4	66	0,1360	0,0039	0,1399	+ 0,0002
5.	0,1282	0,0525	4	64	0,1246	0,0038	0,1284	+ 0,0002
6.	0,0528	0,1454	4,5	64	0,0504	0,0038	0,0542	+ 0,0014
7.	0,0494	0,1371	4,5	60	0,0459	0,0036	0,0495	+ 0,0001

Aus den mitgetheilten Resultaten ergibt sich, dass auf diese Weise die Harnsäure auch vom Guanin anstandslos getrennt werden kann. Da die Filtratmenge (+ Waschwässer) grösser ist, muss auch hier entsprechend der Menge des Filtrats eine Correctur der gewogenen Harnsäuremenge vorgenommen werden.

Diese erhaltenen Resultate zeigen nur insofern ein anderes Verhalten, als durch das Guanin die Löslichkeit der Harnsäure nicht gesteigert wird, was das Xanthin in geringem Grade doch bewirkt. Bei diesen Versuchen ergibt sich meistens ein geringes Plus an gefundener Harnsäure, welches offenbar nur davon herrührt, dass die Correcturen nicht ganz entsprechend sein dürften — wahrscheinlich löst sich beim Auswaschen der Harnsäure etwas weniger von derselben, als wenn dieselbe mit der Flüssigkeit durch längere Zeit in Berührung bleibt, oder aus einer Lösung auskrystallisirt.

Die nach der Trennung erhaltene Harnsäure wurde in jedem einzelnen Falle auf ihre Reinheit, bzw. auf den möglichen Guaningehalt geprüft. Man könnte dabei in dieser Weise vorgehen, dass man die Lösung derselben mit Silberlösung fällen und den Niederschlag in Salpetersäure in üblicher Weise lösen würde. Die hierauf ammoniakalisch gemachte Lösung müsste dann einen Niederschlag von Guaninsilber ausscheiden, falls der Harnsäure Guanin beigemischt wäre, denn die Harnsäureverbindung des Silbers wird durch Salpetersäure zerstört. In den vorliegenden Versuchen wurde die isolirte Harnsäure mit verdünnter Salpetersäure (5 : 100) erwärmt, wie es Wulff zum Nachweise des Xanthins that. Auch sehr geringe Guaninmengen, die der Harnsäure beigemischt sind, können auf diese Weise nachgewiesen werden, da die mit Ammoniak neutralisirte salpetersaure Lösung mit ammoniakalischer Silberlösung eine Fällung, oder wenigstens eine Trübung gibt, auch wenn nur Spuren von Guanin zugegen sind, wie folgende Versuche zeigen:

0,1200 gr. Harnsäure + 0,0025 gr. Guanin wurden mit 10 ccm. verdünnter Salpetersäure (nach Wulff) behandelt. Mit Silberlösung entstand sofort ein flockiger Niederschlag.

0,1100 gr. Harnsäure + 0,0020 gr. Guanin in derselben Weise behandelt lieferten dasselbe Resultat.

0,1310 gr. Harnsäure + 0,0005 gr. Guanin in derselben Weise behandelt gaben mit ammon. Silberlösung eine deutliche Trübung.

Die in den obigen Versuchen isolirte Harnsäure erwies sich in allen Fällen als rein.
