

# Ueber eine Methode zur quantitativen Bestimmung der sog. Xanthinkörper im Harne.

Von

**M. Krüger** und **C. Wulff**, Apotheker.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin und aus der  
Irrenanstalt Herzberge der Stadt Berlin.)  
(Der Redaction zugegangen am 22. Juni 1894.)

Mit dem Namen Xanthinkörper bezeichnet man eine Reihe von im Thier- und Pflanzenreich häufig vorkommenden Basen, welche in ihren Reactionen und ihrer Zusammensetzung sowohl unter einander wie mit der Harnsäure nahe verwandt sind: hierzu gehören Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Adenin, Heteroxanthin (Methylxanthin), Theobromin, Theophylin und Paraxanthin (Dimethylxanthine), Coffein (Trimethylxanthin), endlich Carnin. Dieser Reihe sind die kürzlich beschriebenen<sup>1)</sup>, synthetisch dargestellten Basen, Methyladenin und Dimethylhypoxanthin, hinzuzufügen.

In rein chemischem Sinne können zu den Xanthinkörpern nur Xanthin selbst und seine Homologen, ferner das in seiner Constitution nur wenig vom Xanthin sich unterscheidende Guanin gerechnet werden; nicht aber Körper, wie Hypoxanthin und Adenin, deren Constitution<sup>2)</sup> ebenso stark, wie die der Harnsäure, vom Xanthin abweicht.

A. Kossel hat für die 4 bisher im Zellkern gefundenen und deshalb eine hervorragend wichtige physiologische Rolle spielenden Basen, Xanthin, Guanin, Hypoxanthin und Adenin, den Namen «Nucleinbasen» vorgeschlagen. Mit dem Namen

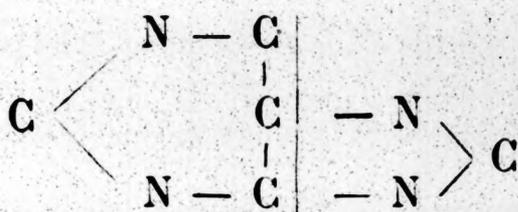
<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 423.

<sup>2)</sup> Ebendasselbst, Bd. 18, S. 469.

Xanthinbasen<sup>1)</sup> im engeren Sinne bezeichnet er die genannten, vom Xanthin und Guanin sich ableitenden Basen, während er die in gleicher Weise vom Hypoxanthin und Adenin derivirenden Körper mit Sarkinbasen bezeichnet. Nach dieser Nomenclatur sind zu zählen zu den Xanthinbasen: Xanthin, Heteroxanthin, Theobromin, Theophyllin, Coffein und Guanin; zu den Sarkinbasen: Adenin, Methyladenin, Hypoxanthin und Dimethylhypoxanthin.

Man könnte für die Xanthinbasen älteren Sinnes daher den Namen «Xanthin- und Sarkinbasen» vorschlagen; einmal wäre jedoch ein solcher Name schon seiner Länge wegen unbequem, ferner ist es fraglich, ob in ihm Basen, wie Carnin, deren Constitution noch unbekannt, einbegriffen sind, endlich liegt die Möglichkeit der Existenz von Basen vor, welche ihrer Constitution und ihren Eigenschaften nach zu derselben Gruppe von Körpern gehören und die dennoch nicht als Derivate des Xanthins und Hypoxanthins anzusehen sind. Hierauf ist schon an anderer Stelle<sup>2)</sup> aufmerksam gemacht worden.

Alle Xanthinkörper (älteren Sinnes) zeigen in ihren Constitutionen eine weitgehende Uebereinstimmung: sie enthalten sämtlich, wie Harnsäure, einen Alloxan- und Harnstoffkern, wenn unter «Kern» die Alloxan und Harnstoff charakterisirende Gruppierung der C- und N-Atome verstanden wird. Beide Kerne sind ausserdem in bestimmter Weise mit einander verbunden, wie folgendes Schema angibt:



Alloxan-      Harnstoffkern.

Zweckmässig wird man daher für die genannte Körperklasse einen solchen Namen wählen, der die Aehnlichkeit in der Constitution zum Ausdrucke bringt. Prof. A. Kossel und der eine von uns (Krüger) schlagen daher für die Harn-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 541.

<sup>2)</sup> Ebendasselbst, Bd. 18, S. 472.

säure und die genannten Basen den Namen «Alloxurkörper» vor; die Basen allein wären demnach als Alloxurbasen zu bezeichnen. Alloxur ist von Alloxan und Urea hergeleitet.

Von den Alloxurbasen sind einige als regelmässige Bestandtheile des Harnes erkannt worden: Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Carnin, Paraxanthin und Heteroxanthin. In neuerer Zeit ist von P. Balke<sup>1)</sup> und Salomon<sup>2)</sup> eine neue im Harn vorkommende Base beschrieben worden, welche jedoch nach der von Balke gegebenen Formel  $C_4H_6N_3O$  nicht zu den Alloxurbasen gerechnet werden kann.

Die Menge der mit dem Harn ausgeschiedenen Alloxurbasen ist nur eine sehr geringe. Nach Baginsky werden mit 100 cem. Harn 2,8—3,8 mgr. Basen ausgeschieden. Eine Vermehrung der Alloxurbasen findet mit Sicherheit statt bei Leukämie, wahrscheinlich auch bei acuter Leberatrophie und bei Krankheiten der nervösen Centralorgane. Im leukämischen Harn ist auch Adenin von Stadthagen gefunden worden.

Die bisherigen Untersuchungen über die Alloxurbasen des Harnes haben sich auf den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung der einen oder anderen Base beschränkt. Eine auch bei geringen Mengen Harnes anwendbare Methode, welche Aufschluss über die Gesamtausscheidung der Alloxurbasen gibt, existirt bisher nicht.

Vor Kurzem ist von einem von uns (Krüger) gezeigt worden, dass Harnsäure aus nur harnsaure Salze enthaltenden Lösungen als auch aus Harn quantitativ durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt werden kann. Es schien in diesem Abscheidungsverfahren eine einfache und auch für klinische Zwecke geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure gegeben zu sein; es brauchte nur eine bestimmte Menge Harn in der früher angegebenen Weise mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt und der im Niederschlage nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmte Stickstoff unter Anwendung einer Correctur für die mitausgefällten Alloxurbasen auf Harnsäure umgerechnet zu werden.

<sup>1)</sup> Journal f. prakt. Chem., Bd. 47, S. 537.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 207.

Es wurde daher in einer Reihe von Harnen der durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit fällbare Stickstoff bestimmt; gleichzeitig wurde der Harnsäure-Stickstoff nach der Methode von Salkowski-Ludwig ermittelt. Die nach beiden Methoden ermittelten Zahlen zeigten jedoch bedeutende Abweichungen; im Mittel wurden 20,6% N durch Kupferoxydul mehr gefällt, als in Form von Harnsäure vorhanden sein könnte. Da ausserdem die Differenzen innerhalb sehr weiter Grenzen lagen, musste die Idee, die Menge der Harnsäure aus dem N-Gehalte der Kupferoxydul-fällung zu berechnen, aufgegeben werden.

Welche N-haltigen Bestandtheile des Harns werden nun neben Harnsäure durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit mitgefällt? Sind es nur Alloxurbasen? Dann müsste die Menge derselben grösser sein, als bisher angenommen wurde. Oder werden neben Alloxurkörpern noch andere N-haltige Bestandtheile des Harns gefällt?

Harnstoff, Kreatin, Kreatinin verhalten sich der früheren Mittheilung nach negativ. Ebenso wenig werden Amidosäuren, Peptone und Albumosen gefällt; ja selbst Körper, die in ihrer Constitution so wenig von den Alloxurkörpern abweichen, wie Allantoin, und die mit ammoniakalischer Silberlösung wie jene Niederschläge geben, gehen mit Kupferoxydul keine Verbindungen mehr ein. Kupfersulfat und Natriumbisulfit kann daher als ein spezifisches Reagens auf Alloxurkörper angesehen werden.

Endgiltigen Aufschluss über die Frage, ob in dem Kupferoxydulniederschlage des Harns sich ausser Alloxurkörpern noch andere Harnbestandtheile befinden, hoffen wir durch genaue Untersuchung der aus einer grösseren Menge Harnes erhaltenen Fällungen bringen zu können. Noch beschäftigt mit dieser Untersuchung, denken wir dieselbe demnächst abzuschliessen.

Aus dem vorhergehend Gesagten ergibt sich jedoch schon mit grosser Wahrscheinlichkeit, dass Kupfersulfat mit Natriumbisulfit aus Harn nur Harnsäure und die Alloxurbasen fällt. Hiermit ist eine Methode gegeben, den in Form von Alloxurbasen ausgeschiedenen Stickstoff zu bestimmen: es wird in einem Theile des Harns der N-Gehalt der Harnsäure plus

Basen durch Fällen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit, in einem zweiten Theil der Harnsäure-Stickstoff allein nach Salkowski-Ludwig bestimmt. Sind z. B. in 100 ccm. Harn 0,0210 gr. N im Kupferoxydulniederschlage gefunden und kommen hiervon 0,0164 gr. auf Harnsäure, so würde die Differenz 4,6 mgr. den Stickstoff der Alloxbasen angeben.

Es handelte sich demnach bei der weiteren Untersuchung nur um die Ermittlung der Bedingungen, unter welchen bei der Fällung mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit in ein und demselben Harne übereinstimmende Zahlen für Stickstoff erhalten werden. Aus den früheren Versuchen mit Harnsäure hatte sich schon ergeben, dass die Fällung der Kupferoxydulverbindungen am besten in der Wärme vorgenommen wird; es bleibt nur übrig, festzustellen, wie viel von dem Fällungsmittel auf ein bestimmtes Volumen Harn genommen werden muss und wie lange der Harn nach der Fällung bis zur Filtration stehen bleiben muss.

Von den zahlreichen in dieser Richtung angestellten Versuchen mögen nur die folgenden erwähnt werden. Zur Fällung wurde die in der Kahlbaum'schen Fabrik käufliche Natriumbisulfitlösung, welche ihrem Na-Gehalte nach in 100 ccm. 50 gr. Natriumbisulfit enthält, und eine 13 proc. Kupfersulfatlösung angewendet.

Tabelle I.

Harn-Nr.	Harn-Menge.	NaHSO <sub>3</sub> -Lösung.	CuSO <sub>4</sub> -Lösung.	Zeit zwischen Fällung und Filtration.	<sup>1</sup> / <sub>10</sub> N-Ox alsäure in ccm.
1.	100 ccm.	10 ccm.	10 ccm.	2 $\frac{1}{2}$ Stunde.	25,2 ccm.
1.	100 »	10 »	10 »	12 »	25,1
1.	100 »	10 »	10 »	18 »	25,4
1.	100 »	15 »	15 »	2 $\frac{1}{2}$ »	25,2
1.	100 »	15 »	15 »	12 »	25,5
2.	100 »	5 »	10 »	1 »	26,9
2.	100 »	10 »	20 »	1 »	28,4
2.	100 »	10 »	20 »	6 »	28,6
3.	100 »	10 »	10 »	12 »	27,4
3.	100 »	10 »	10 »	12 »	27,5
3.	100 »	15 »	15 »	12 »	27,5

Die Zahlen der letzten Columne geben die Menge Oxalsäure an, welche zur Neutralisation des Ammoniak aus dem nach der Kjeldahl'schen Methode zerstörten Filter plus Niederschlag verbraucht ist.

Unabhängig von einander kamen wir zu denselben Resultaten, dass zur vollständigen Fällung:

1. Auf 100 ccm. Harn je 10 ccm. der Natriumbisulfit- und der Kupfersulfatlösung stets hinreichend sind;
2. dass der Niederschlag nach der Fällung 2 Stunden stehen bleiben muss.

#### **Ausführung der Harnsäure- plus Alloxurbasenbestimmung im Harn.**

100 ccm. des eiweissfreien Harnes werden in einem Becherglase (200 ccm. Inhalt) bis zum Sieden erhitzt. Zur siedenden Flüssigkeit setzt man 10 ccm. Natriumbisulfit- und unmittelbar darauf 10 ccm. der Kupfersulfatlösung hinzu und erhitzt nochmals bis zum Sieden. Der ursprünglich rein weisse Niederschlag färbt sich hierbei braun. Zum Schlusse gibt man noch 5 ccm. 10 proc. Baryumchloridlösung hinzu; das entstehende Baryumsulfat hat den Zweck, den Kupferoxydulniederschlag besser zum Absitzen zu bringen und die Filtration zu erleichtern. Nach 2stündigem Stehen wird der Niederschlag durch ein Faltenfilter von 10--12 ccm. Durchmesser, welches zweckmässig aus dem schwedischen Papier von J. Munktell bereitet ist, filtrirt und mit ausgekochtem und auf 60° abgekühltem Wasser vollständig ausgewaschen; ein fünfmaliges Uebergiessen des Filters mit Wasser genügt zu diesem Zwecke.

Das noch feuchte Filter gibt man darauf in einen Rundkolben aus Kaliglas von 150 ccm. Inhalt und zerstört Niederschlag und Filter am besten mit dem von J. W. Gunning<sup>1)</sup> empfohlenen Gemisch aus conc. Schwefelsäure und Kaliumsulfat. 15 ccm. conc. Schwefelsäure, 10 gr. Kaliumsulfat, dem man noch einige Krystalle (0,5 gr.) Kupfersulfat hinzusetzt, zerstören die organische Substanz in etwa einer Stunde.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem., Bd. 28, S. 138.

Das von Gunning vorrätig gehaltene Gemisch, aus einem Theil Kaliumsulfat und zwei Theilen Schwefelsäure bestehend, ist bei gewöhnlicher Temperatur eine halbfeste Masse und kann nur aus erwärmten Gefäßen ausgegossen werden; ausserdem verursacht es bei feuchten Substanzen starkes Schäumen. Es empfiehlt sich daher, das feuchte Filter zunächst mit der angegebenen Menge Schwefelsäure und Kupfersulfat bis zum Auftreten reichlicher Schwefelsäuredämpfe zu erwärmen und dann erst Kaliumsulfat hinzuzugeben. Die weitere Verarbeitung der klar gewordenen Schmelze geschieht in der üblichen Weise; zur Verhütung des Stossens der mit Alkali übersättigten Lösung beim Kochen wurde das von Argutinsky<sup>1)</sup> empfohlene Talkum, welches sich vorzüglich bewährt, angewendet. Als Titrirflüssigkeit diente  $\frac{1}{10}$  N-Oxalsäure, als Indicator Rosolsäure.

Nach diesem Verfahren erhält man, wie die folgenden Analysen beweisen (Tab. II und III), bei ein und demselben Harne sehr übereinstimmende Zahlen.

Tabelle II.

Harn-Nr.	Harnmenge.	§ Harnsäure- und Alloxurbasen)-N.			
1.	100 chem.	0,0223 gr.	0,0226 gr.	—	—
2.	100 »	0,0248 »	0,0248 »	—	—
3.	100 »	0,0154 »	0,0154 »	0,0150 gr.	—
4.	100 »	0,0211 »	0,0207 »	0,0205 »	0,0296 gr.
5.	100 »	0,0221 »	0,0222 »	0,0220 »	0,0213 »
6.	100 »	0,0153 »	0,0154 »	0,0151 »	—
7.	100 »	0,0156 »	0,0156 »	0,0160 »	0,0156 »
8.	100 »	0,0232 »	0,0232 »	0,0222 »	—
9.	100 »	0,0236 »	0,0236 »	0,0237 »	—
10.	100 »	0,0221 »	0,0221 »	0,0221 »	—

Die Differenzen bei den einzelnen Analysen liegen innerhalb 0,0—0,5 mgr. N; nur in einem Falle (Harn 5) liegen die beiden Grenzwerte um 0,9 mgr. auseinander.

<sup>1)</sup> Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 46, S. 581.

### Das Verhältniss von Harnsäure-Stickstoff zu Alloxurbasen-Stickstoff im normalen Harn.

Bei den folgenden Harnen wurde einmal die Summe des Harnsäure- und Alloxurbasen-Stickstoffes, andererseits der Harnsäure-Stickstoff nach der Methode von Salkowski-Ludwig ermittelt. Die zur Untersuchung angewandten Harnen waren meistens Milchharnen.

**Tabelle III.**

Harn-Nr.	Harnmenge.	(Harnsäure und Basen) N.	(Harnsäure) N.	Basen-N.	Harn-N : Basen-N.	
1.	100 cbcm.	—	0,0273 gr.	0,0217 gr.	0,0056 gr.	3,9 : 1
2.	»	—	0,0220 »	0,0181 »	0,0039 »	4,6 : 1
3.	»	—	0,0289 »	0,0209 »	0,0080 »	2,6 : 1
4.	»	—	0,0224 »	0,0198 »	0,0026 »	7,6 : 1
5.	»	—	0,0219 »	0,0169 »	0,0050 »	3,4 : 1
6.	»	0,0146 gr.	0,0146 »	0,0109 »	0,0037 »	2,9 : 1
7.	»	0,0266 »	0,0261 »	0,0219 »	0,0044 »	4,9 : 1
8.	»	0,0151 »	0,0149 »	0,0102 »	0,0048 »	2,1 : 1
9.	»	0,0183 »	0,0183 »	0,0131 »	0,0052 »	2,5 : 1
10.	»	0,0218 »	0,0214 »	0,0170 »	0,0046 »	3,7 : 1
11.	»	0,0195 »	0,0198 »	0,0156 »	0,0042 »	3,7 : 1
12.	»	0,0181 »	0,0183 »	0,0147 »	0,0035 »	4,2 : 1
13.	»	0,0236 »	0,0237 »	0,0179 »	0,0058 »	3,1 : 1
14.	»	0,0107 »	0,0107 »	0,0070 »	0,0037 »	2,9 : 1
15.	»	0,0186 »	0,0186 »	0,0151 »	0,0035 »	4,3 : 1
16.	»	—	0,0228 »	0,0182 »	0,0046 »	3,9 : 1
17.	»	0,0212 »	0,0206 »	0,0173 »	0,0031 »	5,6 : 1
18.	»	0,0210 »	0,0216 »	0,0161 »	0,0052 »	3,1 : 1
19.	»	0,0209 »	0,0211 »	0,0164 »	0,0046 »	3,6 : 1

Die absolute Menge des mit 100 cbcm. normalen Harnes ausgeschiedenen Alloxurbasen-Stickstoffes beträgt 2,6—8 mgr. N, im Mittel 4,53 mgr. N; das Verhältniss von Harnsäure-N : Alloxurbasen-N schwankt von 2,1 : 1 bis 7,6 : 1, es beträgt im Mittel aus 19 Analysen 3,82 : 1.

Nimmt man die täglich vom Menschen ausgeschiedene Harnsäuremenge zu 0,7 gr., also Harnsäure-N zu 0,2333 gr. an, so würden in Form von Alloxurbasen **0,0481 gr. N** ausgeschieden werden.

Von den normal mit dem Harn entleerten Alloxurbasen hat Guanin den grössten procentischen Gehalt an Stickstoff, nämlich 46,36% N, Carnin den niedrigsten 28,57% N. Die oben erhaltene Zahl für Alloxurbasen-Stickstoff 0,0481 gr. würde also einer täglichen Ausscheidung von 0,104 gr. Guanin, resp. 0,168 gr. Carnin entsprechen. Am zweckmässigsten dürfte es sein, um aus dem Stickstoffgehalte die absolute Menge der Alloxurbasen des Harns zu berechnen, dieselben als aus gleichen Theilen Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Paraxanthin, Heteroxanthin und Carnin bestehend anzunehmen. Ein solches Gemenge würde einen Procentgehalt von 36,295% N haben; Alloxurbasen-Stickstoff, multiplicirt mit  $\frac{100}{36,295} = 2,755$ .

gibt demnach die absolute Menge der Basen an. Dieselbe beträgt bei normalem Harn im Mittel 0,0481.  $2,755 \text{ gr.} = 0,1325 \text{ gr. pro die.}$

Nach Baginsky werden in 100 ccm. Harn 2,8–3,8 mgr. Alloxurbasen ausgeschieden, die Tagesquantität wäre bei einer Urinmenge von 1,5 Liter nur 0,042–0,057 gr.

Aus den in den Tabellen mitgetheilten Zahlen ergibt sich sowohl zur Genüge, dass die Uebereinstimmung der für Harnsäure- plus Alloxurbasen-Stickstoff erhaltenen Werthe in in jedem Harn innerhalb der erreichbaren Grenzen liegt. Dennoch bleibt die Frage zu entscheiden, in wie weit die Fällung der verschiedenen Alloxurbasen des Harnes durch Kupfersulfat und Natriumbisulfid eine vollständige ist. Ist dieselbe eine quantitative oder muss für die in Lösung gebliebenen Mengen der Basen eine Correctur der Analysenzahlen vorgenommen werden? Bedenkt man jedoch, dass die Zusammensetzung des Basengemenges im Harn nicht nur bei verschiedenen Personen verschieden, sondern auch bei demselben Individuum an verschiedenen Tagen eine wechselnde sein wird, so wird die Anbringung einer Correctur nur möglich sein, wenn die Kupferoxydulverbindungen der Alloxurbasen annähernd eine gleiche Löslichkeit zeigen.

Die Schwerlöslichkeit der Kupferoxydulverbindungen steigt zweifellos mit der Anzahl der im Molecül der Basen enthaltenen,

vertretbaren Imidgruppen und ist vielleicht auch abhängig von der Löslichkeit der Basen selbst. Hiernach darf man die Löslichkeit der Kupferoxydulverbindungen von Guanin und Xanthin, welche 3 Imidgruppen enthalten, als noch geringer erwarten, als sie für die entsprechenden Verbindungen des Adenins (1 : 200,000 Th. heissen Wassers) und des Hypoxanthin (1 : 250,000 Th.) bestimmt wurde. Die Kupferoxydulverbindung des Heteroxanthins, welches wie Adenin und Hypoxanthin 2 Imidgruppen enthält, wird auch eine ähnliche Löslichkeit zeigen (1 : 200,000—250,000).

Wie die Sache beim Paraxanthin und Carnin sich verhält, soll durch spätere Versuche entschieden werden.

Es ist zu erwarten, dass die beschriebene Methode zur Bestimmung des Harnsäure- plus Basen-Stickstoffes bei allen Untersuchungen nach der Herkunft der Harnsäure, resp. Beziehung der Harnsäure zu den Alloxurbasen eine nicht unwichtige Rolle spielen wird. In manchen Fällen dürfte auch die Kenntniss des Harnsäure- plus Basen-Stickstoffes ein grösseres Interesse beanspruchen als die des Harnsäure-Stickstoffes allein; dann stände in dem angegebenen Verfahren eine Methode zur Verfügung, welche auch vom Kliniker ohne grossen Zeitaufwand angewendet werden kann.