

Ueber die titrimetrische Bestimmung der Harnsäure im Harn.

Von

Gottfried v. Ritter.

(Aus dem medicinisch-chemischen Institut der k. k. deutschen Universität in Prag.)
(Der Redaction zugegangen am 9. Oktober 1895.)

Sein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harn führt Hopkins bekanntlich in der Weise aus, dass er aus dem gefällten Ammonurat die Harnsäure durch Salzsäure in Freiheit setzt, und diese entweder wägt oder ihre Menge durch Titiren mit Permanganat ermittelt. Von dieser Methode hat Hopkins¹⁾ eine Abkürzung in Vorschlag gebracht, welche darin besteht, dass zur Titrirung das Ammonurat direct verwendet wird.

Der aus 20 cbcm. Harn durch Sättigen desselben mit Chlorammonium erhaltene Niederschlag wird auf einem mit Glaswolle verstopften gewöhnlichen Trichter gesammelt und mit Ammonsulfat chlorfrei gewaschen, was deshalb nöthig ist, weil bei Gegenwart von Chlorid mehr Permanganat verbraucht würde, als die Harnsäure für sich in Anspruch nimmt. Der Niederschlag wird sammt dem Pfropfen in ein Kölbchen gespült, die Flüssigkeit auf 100 cbcm. mit 20 cbcm. concentrirter Schwefelsäure versetzt und die Harnsäure mit $\frac{1}{50}$ n. Permanganat titirt.

Hopkins hat das abgeänderte Verfahren mit dem ursprünglichen verglichen und für 100 cbcm. Harn gefunden nach dem

ursprünglichen Verfahren .	51,5	64,0	40,7	34,4	38,0	46,54 mgr.
abgekürztem Verfahren .	53,2	66,5	41,1	35,5	39,6	46,90

und hält deshalb das abgekürzte Verfahren geeignet für klinische Zwecke.

Ich bin darauf ausgegangen, in unten angegebener Weise zu versuchen, das abgekürzte Verfahren noch weiter zu vereinfachen. Zuvor habe ich mir aber aus eigener Erfahrung

¹⁾ The Journal of Pathologie and Bacteriologie, June 1893, S. 458.

ein Urtheil über die Genauigkeit des abgekürzten Verfahrens von Hopkins und namentlich über die Fehlergrösse bei meinen Bestimmungen zu verschaffen gesucht. Zu diesem Zwecke habe ich in Lösungen reiner Harnsäure sowie im Harn die Harnsäure durch Wägen nach Hopkins und durch Titiren des Ammonurats bestimmt. Da ich in einigen Punkten von der von Hopkins gegebenen Vorschrift abgewichen bin, so erscheint es zweckmässig, das von mir befolgte Verfahren zu beschreiben.

Es wurde immer in vier Portionen Harnsäurelösung oder Harn von je 100 ccm. 30 gr. reines Chlorammon aufgelöst, und nach zwei-stündigem Stehen der Niederschlag abfiltrirt. Ein Paar der Niederschläge wurde zur Wägung der Harnsäure, das andere Paar zur Titirung des Ammonurats verwendet.

Den Glaswollfiltern, auf welchen Hopkins die durch Salzsäure abgeschiedene Harnsäure sammelt, habe ich Asbestfilter vorgezogen, weil diese sich leichter dicht herstellen lassen als die Glaswollfilter. Dazu wurde wolliger Asbest erst mit Salzsäure ausgekocht, dann mit Wasser vollständig chlorfrei gewaschen. Der Asbest kam noch feucht in einen Ludwig'schen Trichter, dessen Schnabel mit einem Wattepfropf ziemlich dicht verstopft war, um das Durchschlüpfen kleiner Asbestfasern zu verhindern, dann wurde das Wasser durch Alkohol verdrängt und der Trichter mit dem Filter bei 110--120° bis zur Gewichtseconstanz getrocknet.

Auf dieses Filter wurde die Harnsäure gebracht, die Mutterlauge für sich aufgesammelt und gemessen und für je 15 ccm. derselben nach Hopkins der gewogenen Harnsäure 1 mgr. hinzugezählt. Das Waschwasser wurde ausnahmslos mit ammoniakalischer Silberlösung auf Harnsäure geprüft und, wenn sich solche in einigermaassen erheblicher Menge nachweisen liess, die Bestimmung verworfen. Wenn das Filter chlorfrei gewaschen war, wurde es wieder bei 110 bis 120° getrocknet.

Für die Titirung des Ammonurats schreibt Hopkins das Sammeln desselben auf einem mit Glaswolle verstopften Trichter vor. Zu einem Theil der Bestimmungen habe ich mich aber Papierfilter bedient, weil man so immer klare Filtrate erhält und nicht wie bei den Glaswollfiltern der Gefahr ausgesetzt ist, den Versuch wegen Undichtigkeit des Filters zu verlieren.

In beiden Fällen wurde das Urat mit zu $\frac{5}{6}$ gesättigter Ammonsulfatlösung chlorfrei gewaschen. Das käufliche Ammonsulfat enthielt Eisenoxydul, und da dieses durch das Permanganat auch oxydirt worden wäre, so ist es vorher durch Schwefelammon abgeschieden worden.

Der Niederschlag wurde mit 100 ccm. Wasser in ein Kölbchen gespült und das Urat nach Zusatz von chlorfreiem Natriumcarbonat in

der Wärme gelöst. Nach dem Abkühlen wurden nach der Vorschrift von Hopkins 20 ccm. conc. Schwefelsäure hinzugefügt und titirt.

Die Titrirung der Harnsäure mit Permanganat bedarf noch einer besonderen Besprechung. Nach der Beschreibung, welche Hopkins von ihr gibt, erscheint sie unsicher und das Verfahren nicht einladend. Anfangs nämlich verschwindet das Permanganat in der saueren Harnsäurelösung augenblicklich an der Stelle, wo die Tropfen in die Flüssigkeit gefallen sind, dann kommt aber ein Punkt, wo die ganze Flüssigkeit roth wird, aber auch nur eine ganz kurze Zeit. Ist das der Fall, so hat man austitirt oder richtiger schon einen kleinen Ueberschuss an Permanganat zugesetzt. Uebersieht man diesen Punkt, so titirt man über. Es ist aber durchaus nicht so schwer als es scheint, das richtige Ende der Reaction zu treffen, wenn man sich auf sie mit abgewogenen Mengen reiner Harnsäure und einer Permanganatlösung von bekanntem Titer einübt.

Die von mir verwandte Permanganatlösung war eine nahezu $\frac{1}{20}$ normale und durch Auflösen einer abgewogenen Menge Permanganat in der berechneten Menge Wasser hergestellt. Der genaue Titer wurde Anfangs ermittelt durch Stellen der Lösung auf eine Eisenoxydullösung, welche durch Auflösen einer abgewogenen Menge Blumendraht in verdünnter Schwefelsäure im Kohlensäurestrom hergestellt war. Da sich ergab, dass mit einer Tetraoxalatlösung dieselben Resultate erhalten wurden wie mit der Eisenoxydullösung, so wurde später der Titer der Permanganatlösung auf eine $\frac{1}{20}$ n. Tetraoxalatlösung gestellt und ausserdem fast vor jeder Harnsäuretitrirung mit ihr controlirt.

Hopkins gibt an, dass der Cubikcentimeter der $\frac{1}{20}$ normalen Permanganatlösung 3,75 mgr. Harnsäure anzeigt. Versuche mit reiner aus dem Sulfat dargestellten oder nach der Vorschrift von Bensch¹⁾ gereinigten Harnsäure ergaben übereinstimmend, dass 1 ccm. des $\frac{1}{20}$ n. Permanganats durch 3,61 mgr. Harnsäure reducirt wurde. Der Unterschied im Factor liegt wohl daran, dass Hopkins seine Permanganatlösung nur durch Wägen des Permanganats herstellte, wäh-

¹⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 54, S. 190 und 193.

rend in meinen Versuchen der Titer der Permanganatlösung besonders gestellt wurde. Die hier mitgetheilten Bestimmungen sind nun auch mit dem Factor 3,61 berechnet.

Nach diesem Verfahren sind die in der folgenden Tabelle verzeichneten Resultate erhalten worden:

	Wägung.	Mittel.	Titration.	Mittel.
Reine Harnsäure.	44,5, 47,0	45,75	45,13, 46,7	45,91
»	44,8, 45,8	45,3	46,02, 46,2	46,1
»	46,9, 47,3	47,1	47,65, 48,7	48,17
Fieberharn	96,3, 97,5	96,9	98,2, 99,3	98,75
»	56,8, 57,1	56,95	58,5, 59,6	59,1
Stark eiweisshalt. Harn	55,4, 58,3	56,85	55,96, 55,96	55,96
D. v. Eiw. befreite vorige H. . .	50,7, 54,8	52,75	51,26, 56,32	53,79
Normaler Harn	43,2, 45,9	44,55	44,04, 44,4	44,22
»	33,4, 33,5	33,45	31,03, 34,66	32,85
»	39,9, 40,7	40,3	39,6, 40,4	40,0

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, dass durch Wägen im Mittel 51,99, durch Titriren 52,49 mgr. Harnsäure bestimmt wurden, durch Titriren also um wenig mehr als durch Wägen. Dieser Unterschied lässt sich mit Wahrscheinlichkeit daraus erklären, dass beim Auswaschen der Harnsäure auf dem Filter etwas Harnsäure in Lösung gegangen sei, obgleich unter den Einzelbestimmungen auch vier vorkommen, in welchen sich das Umgekehrte ergeben hat, nämlich dass durch Titriren weniger Harnsäure bestimmt wurde als durch Wägen.

Besonders beachtenswerth ist auch, dass ein Eiweissgehalt des Harnes die Titrirung nicht beeinträchtigt. Ferner ist ersichtlich, dass trotz der Färbung des Harnsäureniederschlags die Titrirung nicht falsch ausfällt; der das Ammonurat begleitende Harnfarbstoff ist also ohne Einfluss auf das Resultat.

Vergleicht man die Unterschiede, welche die Zahlen der einzelnen Paare bei den Wägungsbestimmungen darbieten, mit denen der Einzelbestimmungen bei der Titrirung, so stellt sich heraus, dass diese ziemlich gleich sind; die Summe der Abweichungen beträgt bei der Wägung 16,0, bei der Titrirung 14,85 mgr. Bei der Wägung sind also beiläufig ebenso grosse Fehler gemacht worden wie bei der Titrirung und daraus

lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass die Bestimmung der Harnsäure durch Titriren des Ammonurats ebenso genau ausfällt wie die Bestimmung der Harnsäure durch Wägung. Es wäre demnach die Titrirung nicht bloss, wie Hopkins will, für klinische Zwecke, sondern für die Bestimmung der Harnsäure überhaupt zu empfehlen. Das gilt aber nur für den Fall, dass man viele oder wenigstens mehrere Harnsäurebestimmungen neben oder hinter einander auszuführen hat, weil sich sonst die Herstellung der richtigen Permanganatlösung nicht lohnt. Für einzelne Harnsäurebestimmungen ist aus diesem Grunde die Wägung immer noch vorzuziehen.

Bei der Ausführung dieser Versuche habe ich einige Erfahrungen gemacht, die auch Anderen von Nutzen sein werden. Es ist nicht rathsam, das Ammonurat auf Papierfiltern auszuwaschen, obwohl dieses keinen Niederschlag hindurchlässt, weil das Auswaschen mit dem Ammoniumsulfat sehr lange dauert, nämlich einen, selbst zwei Tage. Auf dem Glaswollfilter ist das Auswaschen, auch ohne Anwendung der Luftpumpe, in längstens zwei Stunden beendet; die Glaswollfilter haben aber den Nachtheil, dass sie schwer dicht zu bekommen sind. Man thut daher gut, nicht bloss zwei Harnportionen für die Titrirung vorzubereiten, sondern mehrere, damit man sicher zwei klar filtrirende Proben zu der Titrirung verwenden kann.

Die Glaswollfilter stellt man nach Hopkins aus gewöhnlichen Trichtern her, deren Schnabel man mit der Glaswolle verstopft. Ausserdem muss man aber dafür sorgen, dass sich darüber ein dicker Bausch Glaswolle befindet, auf und in dem das Urat sich ablagert. Lässt man den Bausch weg, so sammelt sich der Niederschlag nur auf der schmalen Fläche des Pfropfes im Schnabel an und verstopft das Filter bald so, dass die Filtration nur äusserst langsam von Statten geht.

Man soll auch nicht bloss 20 ccm. Harn zu einer Bestimmung in Arbeit nehmen, wie Hopkins vorgeschlagen hat, sondern 100 ccm.

Bei dieser Bestimmung muss das Chlorammonium gewaschen werden, weil es bei der Titrirung mit Permanganat

Chlor entbindet und die Titrirung dadurch für die Harnsäure zu grosse Werthe ergibt. Diese Chlorentwicklung liesse sich aber durch Zusatz von Mangansulfat zu der Flüssigkeit vermeiden, und es entstand so die Frage, ob es nicht möglich sei, unter Zusatz des Mangansalzes in dem noch chlorammoniumhaltigen Niederschlag des Ammonurats die Harnsäure richtig zu titiren. Darüber habe ich noch Versuche angestellt.

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass in einer Mischung von 15 cbcm. Salmiaklösung mit 0,3614 gr. Chlor in 10 cbcm. und 5 cbcm. einer $\frac{1}{10}$ n. Mangansulfatlösung bei Gegenwart von concentrirter Schwefelsäure schon der erste Tropfen der $\frac{1}{20}$ n. Permanganatlösung eine dauernd rothe Färbung hervorrief. Wurden von der Salmiaklösung dagegen 20 cbcm. verwendet, so trat auf Zusatz von 2 Tropfen der Permanganatlösung noch keine Endreaction ein, wohl aber beim dritten Tropfen. Es entsprechen aber 15 cbcm. einer Salmiaklösung mit 0,3614 gr. Chlor oder 0,5446 gr. Salmiak in 10 cbcm. ungefähr 3 cbcm. einer gesättigten Salmiaklösung, und so viel hätte in dem Filter zurückbleiben können, wenn 5 cbcm. der Mangansulfatlösung ausreichen sollten, den störenden Einfluss des Chlorids zu beseitigen. Die Trichter mit den Papierfiltern, auf denen der Niederschlag gesammelt wurde, hatten einen Durchmesser von 3,5—4 cm. Filter von dieser Grösse sind aber keineswegs im Stande, 3 cbcm. gesättigter Salmiaklösung ganz aufzusaugen.

In Uebereinstimmung mit dem Resultat des Vorversuchs erwies sich in der That bei der Bestimmung reiner Harnsäure in Mengen, wie sie in 100 cbcm. Harn vorkommen, ein Zusatz von 5 cbcm. der Mangansulfatlösung als ausreichend, wie die unten angeführten Zahlen beweisen.

Zur Bestimmung der Harnsäure im Harn nach dieser Methode wurde nun in folgender Weise verfahren.

Der abfiltrirte Niederschlag wurde, sobald alle Flüssigkeit abgetropft war, zur Entfernung etwaiger, dem Urate anhaftender fremder Bestandtheile drei- bis viermal mit einer gesättigten Chlorammoniumlösung nachgewaschen, hierauf mit heissem Wasser in ein Kölbchen hinuntergespült, Becherglas und der zum Durchstechen des Filters verwendete spitze Glasstab mit heissem Wasser abgespritzt, und das in dem

Kölbchen nun enthaltene Flüssigkeitsvolumen auf 95 ccm. ergänzt, nachdem das Urat in 15—20 Tropfen einer 20procentigen Lösung kohlensauren Natrons, welches nun nicht mehr chlorfrei sein musste, gelöst worden war. Der nun folgende Zusatz von 5 ccm. Mangansulfat erzeugte einen weissen Niederschlag von Manganurat und basischem Mangan-carbonat, der sich aber in der concentr. Schwefelsäure vollkommen löste.

Der Salmiak, welcher zu diesen Versuchen diente, war vorher durch Schwefelammon von Eisenoxydul befreit worden.

Das Verfahren wurde zunächst an reiner Harnsäure geprüft, indem zwei Portionen der Lösung zu je 100 ccm. zur Bestimmung der Harnsäure durch Wägung, zwei andere zur Titrirung verwendet wurden. Das Ergebniss ist in folgender Tabelle enthalten.

Wägung.	Mittel.	Titration.	Mittel.	Titration für 100 mgr. Wäg.
46,2, 46,9	46,55	46,7, 46,8	46,75	100,4
44,8, 45,8	45,3	46,02, 46,2	46,1	101,8
46,9, 47,3	47,1	47,65, 48,7	48,17	102,3

Die Titrirung stimmt zu der Wägung ebenso wie bei den oben mitgetheilten Versuchen, in welchen der Salmiak durch Ammonsulfat gewegewaschen wurde, und demnach scheint auch dieses Verfahren zur Bestimmung reiner Harnsäure als geeignet.

Ganz überraschender Weise hat aber die Anwendung des abgeänderten Verfahrens auf die Bestimmung der Harnsäure im Harn ein durchaus anderes Resultat ergeben, wie folgende Tabelle zeigt.

	Wägung.	Mittel.	Titration.	Mittel.	Titration für 100 mgr. Wäg.
1.	42,3, 43,2	42,75	43,1, 43,8	43,45	101,6
2.	40,3, 40,7	40,5	41,4, 41,5	41,45	102,3
3.	35,6, 36,5	36,05	37,03, 38,9	37,96	105,3
4.	36,6, 37,4	37,0	38,95, 39,8	39,4	106,5
5.	44,8, 45,8	45,3	49,8, 50,07	49,9	110,2
6.	40,8, 43,5	42,15	50,1, 50,6	50,35	119,5
7.	42,8, 43,0	42,9	51,2, 51,4	51,3	119,6
8.	31,4, 32,3	31,85	38,5, 38,5	38,5	120,9
9.	31,6, 32,3	31,95	38,95, 39,8	39,37	123,2
10.	32,1, 32,8	32,45	40,8, 41,2	41,0	126,3
11.	42,3, 42,4	42,35	54,7, 56,4	55,5	131,1
12.	35,2, 35,6	35,4	49,6, 50,4	50,0	141,2

Während bei der reinen Harnsäure die durch Titritiren bestimmte Menge 100,4—102,3% der durch Wägen bestimmten Menge betrug, halten sich bei den Harnen nur zwei Proben innerhalb dieser Grenzen; die übrigen gehen alle zum Theil sehr bedeutend, bis 141,2%, über sie hinaus.

In der Befürchtung, dass die Abweichungen vielleicht doch durch einen zu geringen Zusatz von Mangansulfat verursacht sein könnten, habe ich noch in fünf anderen Harnen, deren Resultate nicht mit in die Tabelle aufgenommen worden sind, die Titrirung unter Zusatz von 5 und von 10 chem. der Mangansulfatlösung ausgeführt, aber dabei keine grösseren Unterschiede gefunden, als wie sie auch zwischen gleichen Proben auftreten. Unter diesen fünf Harnen aber waren drei, welche bei der Titrirung 118—126% Harnsäure ergaben, wenn die durch Wägung gefundene Menge gleich 100 gesetzt wird. Aus einem Mangel an Mangansulfat lässt sich also dieser Unterschied nicht erklären.

Aus den angeführten Zahlen folgt somit, dass die Bestimmung der Harnsäure im Harn durch Titritiren des Ammonurats mit Permanganat in Gegenwart von Chlorammonium nicht zu richtigen Resultaten führt. Das Auswaschen mit Ammonsulfat lässt sich nicht umgehen.

Warum der Harn sich anders verhält, als eine Lösung reiner Harnsäure, darüber lassen sich nur Vermuthungen aussprechen. Alle nach dem abgeänderten Verfahren untersuchten Harne waren normal und man kann daher auch nicht in abnormen Bestandtheilen den Misserfolg suchen. Man könnte daran denken, dass vielleicht der Farbstoff des Harnes, welcher mit dem Urat ausfällt, das Resultat der Titrirung erhöhe; allein die in der Harnsäure enthaltene Menge Farbstoff ist sicher nur sehr gering und kommt bei der Titrirung so gut wie nicht in Betracht, wie die früheren Titritirungen zeigen, bei denen das Urat auch gefärbt war. Allerdings waren die vier Harne, welche die besten Resultate ergaben, wenig gefärbt; aber der Harn Nr. 12, welcher die stärkste Abweichung darbietet, war ebenso hell wie die ersten vier.

Hopkins¹⁾ gibt an, dass von den Harnbestandtheilen auch das Xanthin durch Sättigen mit Chlorammon gefällt wird, das Hypoxanthin und Kreatinin dagegen nicht. Für die Titrirung des mit Ammonsulfat gewaschenen Niederschlages ist dieser Umstand, wie die angeführten Zahlen ergeben, sicher belanglos, und auch für die Bestimmung der Harnsäure nach der in Rede stehenden Methode kann das Xanthin nur von geringer Bedeutung sein. Denn auch unter der Annahme, dass das Xanthin bei der Titrirung mit Permanganat viel mehr Sauerstoff verbraucht als die Harnsäure, kann die um 10% der Harnsäure schwankende Menge der Xanthinbasen, welche neben der Harnsäure im Harn vorkommt, keine so grossen Unterschiede verursachen, wie einzelne in meinen Bestimmungen aufgetreten sind.

Das Einzige, was sich mit Sicherheit sagen lässt, ist, dass es sich um eine oder mehrere Substanzen handelt, welche in gesättigter Salmiaklösung unlöslich, in gesättigter Ammonsulfatlösung aber löslich sind. Ihre genaue Kenntniss berührt jedoch die vorliegende Frage nicht und muss weiterer Nachforschung überlassen bleiben.

¹⁾ A. a. O., S. 452.