

Ueber die Bestimmung der Xanthinbasen im Harn.

Von

Robert Arnstein, Demonstrator.

(Aus dem medicinisch-chemischen Institute der k. k. deutschen Universität in Prag)

(Der Redaction zugegangen am 15. Juni 1897.)

Einer indirekten Bestimmung der Xanthinbasen im Harn liegt der Plan zu Grunde, den Stickstoffgehalt der Alloxurkörper zu ermitteln und von ihm den Stickstoffgehalt der gesondert bestimmten Harnsäure abzuziehen. Die Differenz beider Werthe wäre ein Maass für die im Harn enthaltenen Xanthinbasen. Ein solches Verfahren würde sich, wie auch die Erfahrung gezeigt hat, durch seine Einfachheit empfehlen. Die Art, wie die Harnsäure zu bestimmen sei, erscheint nicht zweifelhaft: worauf es noch allein ankommt, ist die Ermittlung eines hinreichend genauen Verfahrens zur Bestimmung der Alloxurkörper.

Für diesen Zweck sind mehrere Methoden in Vorschlag gebracht worden. Von dem Verfahren von Krüger und Wulff hat Professor Huppert¹⁾ kürzlich gezeigt, dass es nicht verwendbar ist, weil durch das Kupferoxydul ausser den Xanthinbasen noch andere im Harn vorkommende stickstoffhaltige Verbindungen gefällt werden, nämlich Eiweiss und Rhodan.

Von ähnlichen Methoden kommen noch zwei in Betracht, die von Camerer²⁾ angegebene und die von Haycraft.

1) Huppert, diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 556.

2) Camerer, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 26, S. 104, 1890, u. Bd. 28, S. 72, 1891.

Camerer fällt wie Ludwig die Alloxurkörper mit ammoniakalischer Silberlösung, aber nicht zugleich mit dem Tripelphosphat, sondern für sich in der von dem zuerst erzeugten Tripelphosphatniederschlage abfiltrirten Flüssigkeit: auf diese Weise wird es möglich, den Stickstoffgehalt der Alloxurkörper allein zu bestimmen. Auch von den nach Haycraft (richtiger Ludwig) zugleich mit dem Tripelphosphate gefällten Alloxurkörpern lässt sich der Stickstoffgehalt ermitteln, wenn man, wie Professor Huppert gethan hat, den ausgewaschenen Niederschlag in Bisulfit löst und aus der Lösung die Alloxurkörper mit Kupferoxydul niederschlägt. Das Verfahren von Haycraft wird auf diese Weise mit den anderen, auf einer Stickstoffbestimmung beruhenden Methoden direkt vergleichbar.

Von dem auf diese Art abgeänderten Haycraft'schen Verfahren hat Professor Huppert bereits nachgewiesen, dass man nach demselben weniger Stickstoff findet als nach der Methode von Krüger und Wulff. Aber darum, weil ein Verfahren weniger Stickstoff ergibt als ein anderes, mit einer fehlerhaften Vergrößerung des Resultats behaftetes, kann man doch hieraus allein für jenes nicht den Anspruch auf vollkommene Richtigkeit erheben. Eine sorgfältige Prüfung der Methoden ist aber um so nothwendiger, als es sich bei der Bestimmung der Xanthinbasen allen Erfahrungen nach nur um relativ kleine Werthe handelt und Fehler der Methode für die Resultate schwer ins Gewicht fallen.

Demgemäss habe ich unter Professor Huppert's Leitung das Verfahren von Camerer und das modificirte von Haycraft einer weiteren Untersuchung unterzogen, indem zunächst die nach beiden Methoden erhaltenen Niederschläge mit einander verglichen wurden. Es wurden nach jedem Verfahren immer wenigstens zwei Bestimmungen ausgeführt. Da zu befürchten war, dass bei Camerer mit dem Tripelphosphat auch Harnsäure ausfallen könne, und zwar umsomehr, je länger der mit Magnesiainischung versetzte Harn stand, wurde das Tripelphosphat sofort nach seiner Erzeugung abfiltrirt und das Filtrat ohne Verzug in Arbeit genommen.

Das Resultat dieser vergleichenden Bestimmungen ist in folgender Tabelle enthalten. Die Zahlen entsprechen den Mittelwerthen aus mindestens je zwei Analysen und beziehen sich auf 100 cem. Harn. Von den Harnen waren alle bis auf zwei im gewöhnlichen Sinne eiweissfrei: der Harn Nr. 2 enthielt Pepton, Nr. 20 Zucker, Nr. 22 Eiweiss und Zucker.

Tabelle I.

| Harn | Stickstoff im | | Differenz im N | | Harn | Stickstoff im | | Differenz im N | |
|------|----------------------------------|---|-------------------|------|------|----------------------------------|---|-------------------|------|
| | Ag- Nieder- schlag mgr. | Cu ₂ O- Nieder- schlag mgr. | Cu ₂ O | Ag | | Ag- Nieder- schlag mgr. | Cu ₂ O- Nieder- schlag mgr. | Cu ₂ O | Ag |
| 1. | 32,39 | 31,12 | — | 1,27 | 12. | 15,31 | 15,58 | + | 0,27 |
| 2. | 29,54 | 28,42 | — | 1,12 | 13. | 13,93 | 15,26 | + | 1,33 |
| 3. | 28,84 | 28,56 | — | 0,28 | 14. | 13,13 | 13,72 | + | 0,59 |
| 4. | 27,97 | 28,07 | + | 0,10 | 15. | 12,88 | 13,86 | + | 0,98 |
| 5. | 24,68 | 24,43 | — | 0,25 | 16. | 12,57 | 13,09 | + | 0,52 |
| 6. | 21,98 | 22,58 | + | 0,60 | 17. | 12,39 | 12,74 | + | 0,35 |
| 7. | 21,44 | 22,05 | + | 0,61 | 18. | 12,22 | 12,65 | + | 0,43 |
| 8. | 20,51 | 21,35 | + | 0,84 | 19. | 11,41 | 12,06 | + | 0,65 |
| 9. | 19,16 | 20,62 | + | 1,46 | 20. | 9,42 | 10,15 | + | 0,73 |
| 10. | 17,22 | 18,41 | + | 1,19 | 21. | 5,78 | 7,18 | + | 1,40 |
| 11. | 17,22 | 17,33 | + | 0,11 | 22. | 2,99 | 4,32 | + | 1,33 |

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, beträgt der Stickstoffgehalt des Silberniederschlags nach Camerer im Mittel um 0,18 mgr. oder ungefähr 2,5% weniger als der des Kupferoxydniederschlags nach Haycraft. In Anbetracht des Umstandes nun, dass die allerdings nur geringe Differenz doch weitaus in der Mehrzahl der Fälle zu Gunsten des Kupferoxydniederschlags ausfällt, wird man sie wohl nicht ohne Weiteres aus Versuchsfehlern zu erklären haben. Wäre sie in den Methoden begründet, so könnte man daran denken, dass bei dem Verfahren von Camerer mit dem Tripelphosphat etwas Harnsäure gefällt würde, oder dass bei dem Verfahren von Haycraft andere stickstoffhaltige Substanz in den Nieder-

schlag mit einginge. Inwieweit die Resultate durch diese beiden Fehlerquellen beeinträchtigt werden können, darauf wurde die weitere Untersuchung gerichtet.

Von stickstoffhaltigen Substanzen des normalen Harns, welche sich neben den Alloxurkörpern im Silberniederschlag vorfinden können, sind die Eiweisskörper und die Rhodansalze zu berücksichtigen. Bezüglich der Rhodansalze stellte sich in meinen Untersuchungen heraus, dass bei beiden Methoden selbst ein ausserordentlich starker Zusatz von Rhodanid zum Harn den Stickstoffgehalt des Silberniederschlages nicht erhöht, wenn dafür gesorgt wird, dass die Fällung bei Gegenwart einer hinreichenden Menge von Ammoniak erfolgt. So habe ich in dem nach Camerer hergestellten Silberniederschlage eines Harns (Nr. 12 der Tabelle I) vor dem Zusatze von Rhodansalz für 100 ccm. Harn 15,31 mgr. N gefunden, nach Zusatz von 5 ccm., von 10 ccm. und von 20 ccm. 0,1 normalem Rhodan ammonium 15,09 mgr., 15,09 mgr. und 14,95 mgr. N. Nach der modificirten Haycraft'schen Methode fand ich in 100 ccm. desselben Harns 15,58 mgr. N. nach Zusatz von 5 ccm., 10 ccm. und 20 ccm. 0,1 normaler Rhodanlösung wiederum 15,19 mgr., 14,95 mgr. und 14,88 mgr. N. Die Werthe sind etwas zu klein ausgefallen, wohl weil die angewandte sehr grosse Menge Ammoniak etwas von der Silberverbindung der Xanthinbasen gelöst hat. Der Zusatz von Rhodanid überschreitet aber weit den Gehalt des normalen Harns an dieser Substanz. Die grösste Zahl, welche dafür angegeben wird, die von J. Munk, beträgt 0,11 gr. für 1 Liter Harn: 1 ccm. 0,1 normaler Rhodanlösung entspricht aber schon 9,7 mgr. Rhodankalium.

Minder günstig liegen für das abgeänderte Haycraft'sche Verfahren die Verhältnisse bei eiweisshaltigem Harn. Um den Einfluss des Eiweisses auf die Bestimmung der Alloxurkörper kennen zu lernen, wurde eiweissfreier Harn, dessen Gehalt an Alloxurkörpern bekannt war, durch Zusatz völlig klaren Blutserums auf einen Eiweissgehalt von 0,05—0,30% gebracht, in einem Falle auch mit klarer Eieralbuminlösung, sowie in 2 Fällen mit Albumoselösung versetzt. Der Gehalt dieser an Albumose wurde nach dem durch das Krüger-Wulff'sche

Verfahren fällbaren Stickstoff bemessen. Die folgende Tabelle gibt an, wieviel Stickstoff auf 100 cem. Harn im Silber- und im Kupferoxydulniederschlag gefunden wurde.

Tabelle II.

| Harn | Eiweissgehalt | Stickstoff | |
|------|--------------------------------|-------------------------|--|
| | | im Ag-Niederschlag mgr. | im Cu ₂ O-Niederschlag mgr. |
| 1. | 0 | 21,98 | 22,58 |
| | 0,04 % (Albumose) | 22,89 | 22,89 |
| | 0,30 % (Eieralbumin) | 22,51 | 25,55 |
| | 0,30 % (Blutserum) | 23,73 | 26,22 |
| 2. | a 0 | 17,22 | 17,33 |
| | b 0,05 % (Blutserum) | 17,75 | 20,76 |
| | c 0,05 % | 17,85 | 22,86 |
| | d 0,15 % | 18,24 | 19,92 |
| | e 0,25 % | 18,97 | — |
| | f 0,15 % | 18,03 | 23,03 |
| | g 0,30 % | 17,47 | 23,49 |
| | h 0,25 % | 17,50 | — |
| 3. | a 0 | 24,61 | 23,90 |
| | b 0,25 % (Blutserum) | 24,33 | 24,26 |
| | c 0,26 % (Albumose) | 24,92 | 24,43 |

In den Fällen 2e und 2h wurden keine Bestimmungen nach Haycraft ausgeführt.

- 2 d Die Fällung erfolgte in Gegenwart von viel Ammoniak.
- 2 f Das Eiweiss wurde durch Kochen des nativ sauren Harns entfernt.
- 2 g Der Harn wurde vor dem Kochen noch mit Essigsäure versetzt; das Filtrat gab jedoch mit Essigsäure und Ferrocyanium noch einen deutlichen Niederschlag.
- 2 h u. 3. b) Der Harn wurde mit soviel Essigsäure versetzt, dass das Filtrat des gekochten Harns mit Essigsäure und Ferrocyanium nur noch eine kaum wahrnehmbare Trübung zeigte.

Nach den angeführten Zahlen wird also durch einen Gehalt des Harns von 0,26 % Albumose der Befund an Alloxurkörpern

weder bei dem Verfahren von Camerer, noch bei dem von Haycraft beeinflusst. Die Albumosemenge ist nicht zu gering bemessen, da Maixner in peptonarmem Harn 0,065^o in peptonreichem 0,3^o und darüber fand.

Dagegen hat sich bei den mit Blutserum versetzten Harnen ergeben, dass bei beiden Methoden zwar bei Weitem nicht alles, aber doch ein nicht zu vernachlässigender Theil mit den Alloxurbasen ausfällt, und zwar bei der abgeänderten Haycraft'schen Methode mehr als bei dem Verfahren von Camerer. Während nämlich bei Camerer ein Eiweissgehalt des Harns von 0,05^o den Stickstoffgehalt des Niederschlages nur innerhalb der Versuchsfehler erhöht und sich erst ein Eiweissgehalt von 0,15^o störend bemerklich macht, ist diese Beeinträchtigung des Resultats bei Haycraft schon bei 0,05^o Eiweissgehalt zu beobachten. Der Fehler wird auch dadurch nicht vollständig beseitigt, dass man, wie dies bei 2. d (Tab. II) geschah, die Fällung in stark ammoniakalischer Flüssigkeit vornimmt und den Niederschlag, um etwa gebildetes Silberalbuminat zu entfernen, tüchtig mit Ammoniak wäscht. Bei Camerer wird, wie 2. g (Tab. II.) ergibt, der Fehler schon durch eine annähernd vollständige Fällung des Eiweisses beseitigt, bei Haycraft dagegen erst nach möglichst vollständiger Coagulation (Tab. II. 3. b).

Im Principe sind die Methoden von Camerer und von Haycraft gleich, denn in beiden Fällen werden die Alloxurkörper durch ammoniakalische Silberlösung gefällt. Wenn sich nun dem Silberniederschlage bei Camerer weniger Eiweiss beimengt als bei Haycraft, so muss das einen besondern Grund haben, und dieser kann nur darin gesucht werden, dass bei Camerer der Tripelphosphatniederschlag gesondert vom Silberniederschlage, bei Haycraft hingegen zugleich mit diesem erzeugt wird. In der That lässt sich in dem einfachen Tripelphosphatniederschlage aus einem mässig eiweisshaltigen Harn, wenn der Niederschlag auf ein Saugfilter gebracht, und ebenso gewaschen wird wie der silberhaltige bei Haycraft, unzweifelhaft Eiweiss nachweisen. Die Lösung des Tripelphosphatniederschlages in Essigsäure gibt nämlich mit Ferrocyankalium

einen flockigen Niederschlag, mit Salzsäure und Jodquecksilberkalium eine reichliche Fällung, ferner eine unzweifelhafte Xanthoproteinreaction und bei Verwendung von viel Lauge bei der Biuretprobe eine zwar schwache, aber unverkennbare, violette Färbung. Der einfach filtrirte, nicht abgesogene Tripelphosphatniederschlag erweist sich noch reicher an Eiweiss als der ausgewaschene. Es wird also schon durch die Fällung des Harns mit Magnesiamischung ein ansehnlicher Theil des Eiweisses aus dem Harn entfernt, und deshalb bietet sich bei der nachträglichen Fällung mit Silberlösung bei Camerer weniger Gelegenheit zur Bildung eines Albuminatniederschlages, während das Eiweiss, welches beim Haycraft'schen Verfahren im Niederschlage enthalten ist, bei der nachträglichen Behandlung mit Kupferoxydulösung vollständig mit den Alloxurkörpern gefällt wird und so den Stickstoffgehalt des Kupferoxydulniederschlages erhöht.

Der Umstand, dass bei dem Verfahren von Haycraft selbst aus schwach eiweisshaltigem Harn immer etwas Eiweiss gefällt wird, ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Zunächst hat man nach den vorliegenden Versuchen eine gewisse Berechtigung, die Thatsache, dass bei «eiweissfreien» Harnen nach Haycraft in den Alloxurkörpern in der Regel etwas mehr Stickstoff gefunden wird als nach Camerer, aus dem wenn auch geringen Eiweissgehalte des normalen Harns zu erklären. Ferner ist zu berücksichtigen, dass in den vergleichenden Bestimmungen, welche Professor Huppert mit dem Verfahren von Haycraft und dem von Krüger und Wulff ausgeführt hat, wegen des Ueberganges von Eiweiss in den Haycraft'schen Niederschlag der Fehler zu Ungunsten des Verfahrens von Krüger und Wulff noch etwas grösser wird, als von Professor Huppert angenommen wurde. Endlich erscheint es vielleicht auch möglich, die oft ganz beträchtlichen, 100^o erreichenden Unterschiede, welche zwischen der Bestimmung der Harnsäure nach Ludwig und nach dem ursprünglichen Verfahren von Haycraft (Titriren des Silbers im Niederschlage) von Einigen angegeben wurden, zum Theile wenigstens aus einem Gehalte des Niederschlags an Silberalbuminat zu erklären.

Aus dieser Untersuchung ergibt sich also, dass man bei beiden von mir verglichenen Methoden von der Gegenwart der Rhodanverbindungen im Harn Nichts zu befürchten hat, ferner, dass bei dem Verfahren Camerer's die Gefahr, dass sich Eiweiss dem Niederschlage der Alloxurkörper beimengt, viel geringer ist und sich leichter vermeiden lässt als bei dem Verfahren von Haycraft. Da nun andere stickstoffhaltige Bestandtheile des Harns ausser den Alloxurkörpern durch ammoniakalische Silberlösung bekanntermaassen nicht gefällt werden, so kann die Methode Camerer's für ihren Zweck mit grösserer Aussicht auf die Erlangung richtiger Resultate benützt werden als andere ähnliche. Wieweit das von Salkowski¹⁾ angegebene und von ihm neuerdings wieder gepriesene Verfahren denselben Anspruch erheben kann, bedarf noch näherer Prüfung. Der Umstand, dass nach diesem Verfahren weniger Alloxurbasen gefunden werden als nach Krüger und Wulff, und dass durch ammoniakalische Silberlösung die Alloxurkörper vollständig gefällt werden, ist noch kein Beweis für seine volle Zuverlässigkeit. Auch Kupferoxydul fällt die Alloxurkörper vollständig, und doch führt das Verfahren von Krüger und Wulff zu unrichtigen Resultaten.

Es ist oben gezeigt worden, dass der geringe Unterschied im Alloxurkörperstickstoff zu Ungunsten der Methode Camerer's in ungezwungener Weise nicht daraus erklärt werden kann, dass durch die Magnesiamischung sogleich Harnsäure gefällt wird, sondern vielmehr aus einem geringen Eiweissgehalte des nach Haycraft erzeugten Silberniederschlages. Das Bedenken betreffs des Harnsäureverlustes beim Abfiltriren des Tripelphosphats kommt also in Wegfall. Dagegen entsteht für die Ausführung der Analyse die Frage, ob und wie lange man den Harn nach dem Fällen des Tripelphosphats stehen lassen darf, ohne einen Verlust an Harnsäure zu erleiden. Hierüber geben die in Tabelle III. mitgetheilten Zahlen Auskunft.

1) Salkowski, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 14.

Tabelle III.

(Die Zahlen in der Reihe A zeigen an, wieviel Stunden das Tripelphosphat vor dem Abfiltriren stehen gelassen wurde.)

| Harn | A | Stickstoff im | |
|------|--------|-----------------------|--------------------------------------|
| | | Ag-Nieder-schlag mgr. | Cu ₂ O-Nieder-schlag mgr. |
| 1. | 0 | 32,39 | 31,12 |
| | 1½ St. | 32,20 | |
| | 6 .. | 31,22 | |
| | 12 .. | 26,57 | |
| | 24 .. | 23,35 | |
| 2. | 0 | 24,68 | 24,43 |
| | 2 St. | 24,75 | |
| | 6 .. | 24,64 | |
| | 20 .. | 16,77 | |
| 3. | 0 | 21,44 | 22,05 |
| | 3 St. | 22,05 | |
| | 13 .. | 20,97 | |
| | 24 .. | 14,81 | |
| 4. | 0 | 19,22 | |
| | ¾ St. | 19,46 | |
| | 4 .. | 19,29 | |
| | 16 .. | 19,39 | |
| | 24 .. | 18,94 | |
| 5. | 0 | 15,31 | 15,58 |
| | 3 St. | 15,54 | |
| | 20 .. | 15,19 | |

Bei Harn Nr. 4 wurde keine Bestimmung nach Haycraft ausgeführt.

Daraus ist also ersichtlich, dass man den Harn selbst einige Stunden nach dem Ausfällen des Phosphats stehen lassen kann, ehe eine Einbusse an Harnsäure bemerklich wird. Es ergibt sich aber zugleich, dass die Spuren Tripelphosphat, welche in Lösung bleiben, wenn man sofort filtrirt, ohne Bedeutung für die Bestimmung des Alloxurkörperstickstoffs sind.

Bei der Ausführung des Verfahrens von Camerer ist zunächst darauf zu achten, ob der Harn Eiweiss enthält oder nicht. Als eiweissfrei ist ein Harn anzusehen, wenn er

bei den gewöhnlichen klinischen Prüfungsweisen (der Kochprobe und der Probe mit Ferrocyankalium) keine Reaction gibt. Tritt bei diesen Proben nur eine sehr geringe Trübung auf, so kann man ihn auch verwenden. Eine grössere Menge Eiweiss muss jedoch entfernt werden, wozu man sich des unten angegebenen Verfahrens bedienen kann.

Der Harn darf selbstverständlich kein Sediment von Uraten oder von Harnsäure enthalten: filtrirt braucht er nicht zu werden.

Da zur Kontrolle zwei Analysen ausgeführt werden sollen, bemisst man die Menge Harn darnach. Es werden in einem Messcylinder 240 ccm. Harn mit 30 ccm. Ludwig'scher Magnesiamischung versetzt und mit 20⁰/₀ Ammoniakflüssigkeit auf 300 ccm. aufgefüllt. Nach dem Schütteln der Mischung wird sofort durch ein Faltenfilter filtrirt. Der Harn kann zwar nach den in Tabelle III niedergelegten Resultaten einige Zeit stehen, ohne dass ein Verlust an Alloxurkörpern eintritt, doch ist anderseits ein längeres Zuwarten mit dem Filtriren überflüssig. Vom Filtrate werden je 125 ccm. (= 100 ccm. Harn) in zwei Bechergläser abgemessen, jede Probe mit 10 ccm. Ludwig'scher, mit Ammoniak wie üblich versetzter Silberlösung vermischt. Den Silberniederschlag bringt man, ohne lange zu warten, auf ein Saugfilter von 10 cm. Durchmesser aus aschefreiem Papier. Geht die Flüssigkeit anfangs nicht ganz klar durchs Filter, was sich nur durch eine schwache, homogene Trübung kenntlich macht, so giesst man die ersten 50 ccm. des Filtrats in das Becherglas zurück, spült die Filtrirflasche einigemal mit wenig Wasser nach und vereinigt das Waschwasser mit der Flüssigkeit im Becherglase. Das Filter ist durch den bereits auf dasselbe gebrachten Niederschlag so dicht geworden, dass der Niederschlag nun vollständig zurückgehalten wird. Die Filtration geht langsam vonstatten, aber von dem wiederholt empfohlenen Zusätze schwer löslicher oder unlöslicher Substanzen (Natriumbicarbonat, Calciumcarbonat, Talk) haben wir keinen Vortheil gesehen und ihn deshalb unterlassen. Das Becherglas wird sorgfältig mit ammoniakhaltigem Wasser nachgewaschen. Wenn der Niederschlag vollständig auf das Filter gebracht ist, hat

man ihn völlig ammoniakfrei zu waschen. Uebergiesst man den feuchten Niederschlag mit Wasser, so geht die Filtration sehr langsam vor sich. Viel schneller und nicht minder sicher erreicht man dieses Ziel, wenn man den Niederschlag so weit trocken saugt, dass er rissig wird, und ihn erst dann zu waschen anfängt. Füllt man dabei das Filter jedesmal ganz voll mit Wasser, so verbraucht man ungefähr 250—300 ccm. Wasser und vollendet das Auswaschen in kaum 10—20 Minuten. Als ammoniakfrei kann man das Filter betrachten, wenn die Waschflüssigkeit auf empfindliches Lackmuspapier nicht mehr alkalisch reagirt. Um das Filtrat auf seine Reaction zu prüfen, verfährt man in der Weise, dass man die Filtrirflasche und alle in sie hineinreichenden Theile des Apparats gründlich wäscht, dann wieder vor der Pumpe filtrirt und nun die an der Spitze des Trichters haftende Flüssigkeit auf ihre Reaction untersucht. Der Ammoniakdampf kommt mit allen Theilen des Apparats in der Flasche in Berührung: unterlässt man die Reinigung dieser Theile, so nimmt die alkalische Reaction kein Ende, auch wenn vom Filter schon längst ammoniakfreie Flüssigkeit abgelaufen ist.

Vor der Belichtung braucht man den Niederschlag nicht ängstlich zu hüten, es ist nicht nöthig, dass man im Dunkeln filtrirt, es genügt, wenn man vom Niederschlage sehr helles Tageslicht abhält, etwa durch einen Vorhang vor dem Fenster. In Niederschlag sammt Filter bestimmt man den Stickstoff nach Kjeldahl unter Verwendung von 15 ccm. englischer Schwefelsäure, 0,5 gr. Kupfervitriol und 10 gr. Kaliumsulfat, die man gleich anfangs auf einmal zusetzt. Auf den Stickstoffgehalt des Filters braucht man keine Rücksicht zu nehmen, da ein ausgewaschenes, aschefreies Filter von der erforderlichen Grösse nur wenige Hundertstel mgr. Stickstoff enthält.

Eiweisshaltigen Harn befreit man dadurch vom Eiweiss, dass man ihn mit soviel concentrirter Essigsäure versetzt, bis das Filtrat einer gekochten Probe auf Zusatz von Essigsäure und Ferrocyankalium entweder gar keine oder nur noch eine sehr geringe Trübung zeigt. Man giesst dann soviel Harn, als man zu dem Versuche braucht, in eine Kochflasche oder in

ein Becherglas, ermittelt das Gewicht bis auf die Centigramme, kocht auf und stellt nach dem Erkalten das ursprüngliche Gewicht durch Zutropfen von Wasser wieder her. Dies ist die sicherste Art, den Verlust auszugleichen, welchen die Flüssigkeit beim Kochen durch Verdunsten des Wassers erleidet.

Steht keine Wage zur Verfügung, so kann man sich auch in folgender Weise behelfen. Man füllt den Harn in einen Kolben mit engem und langem Hals bis in den Anfang des Halses, markirt den Stand der Flüssigkeit durch einen angeklebten Zettel, erhitzt vorsichtig bis zum beginnenden Sieden und stellt das ursprüngliche Volumen wieder her, sobald der Harn durch Abkühlen mit kaltem Wasser auf dieselbe Temperatur gebracht worden ist, die er vor dem Kochen besass. Der Wasserverlust beim blossen Aufkochen in einem Kolben ist übrigens nur gering. Der Harn wird nun filtrirt und, wenn er anfangs trüb durch das Filter geht, solange auf dasselbe Filter gegossen, bis das Filtrat klar abläuft.

Das Ansäuern des Harns erfordert einige Geduld. Man nimmt (für 2 Bestimmungen) ungefähr 0,5 Liter in Arbeit und versetzt ihn, wenn er nicht schon bloss sauer reagirt, tropfenweise bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaction mit starker (30 oder 50 proc.) Essigsäure. Jetzt nimmt man die erste Reaction vor. Man stellt dazu das Reagensglas mit einigen Cubikcentimetern Harn in siedendes Wasser, verschliesst das Glas, wenn die Coagulation eingetreten ist, mit dem Daumen und schüttelt auf. Beim Einfüllen der Probe in das Reagensglas lässt sich ein Benetzen der obern Wand nur schwer vermeiden; unterlässt man das Aufschütteln, so kann es geschehen, dass beim nachfolgenden Filtriren Harn mit uncoagulirtem Eiweiss mit in das Filtrat gelangt, und man setzt sich so der Gefahr aus, Eiweiss im Filtrate zu finden, auch wenn der erhitzte Theil keines mehr gelöst enthält. Dieses Verfahren wiederholt man noch einmal, dann kocht man die Probe über freier Flamme, filtrirt und prüft das Filtrat in angegebener Weise. Ist, wie in der Regel, noch Eiweiss vorhanden, so versetzt man den Harn noch mit 1—2 Tropfen Essigsäure und stellt eine neue Probe an. Den weitem Zusatz der Essigsäure bemisst man nach dem Grade, in welchem das Eiweiss im Filtrate abnimmt. Vermindert es sich nicht merklich, so setzt man dem Harn nicht nur einen Tropfen Essigsäure hinzu, sondern gleich mehrere, 3 bis 5, auf einmal. Nur gegen das Ende muss man mit dem Essigsäurezusatz vorsichtig sein. Uebersäuert wird der Harn, wenn man nach dieser Vorschrift verfährt, nicht leicht.

Die Verdünnung, welche der Harn durch den Zusatz von Essigsäure erfährt, ist eine minimale. Bei unseren Versuchen wurden zum Ansäuern von 500 cem. eines von Haus aus sauer reagirenden Harns 12—14 Tropfen 50procentiger Essigsäure gebraucht. Die Verdünnung

welche der Harn hiedurch erfährt, ist also eine so geringe, dass sie füglich vernachlässigt werden kann.

Es fragt sich nun noch, welche Genauigkeit in der Bestimmung der Xanthinbasen bei diesem Verfahren erreicht werden kann. Da sich die Menge des Xanthinbasenstickstoffs aus der Differenz zwischen dem Stickstoff der Alloxurkörper und dem der Harnsäure ergibt, so hängt der Werth des Verfahrens ab von der Genauigkeit, mit welcher diese zwei Grössen ermittelt werden.

Die Bestimmung des Alloxurkörperstickstoffs nach dem von mir befolgten Verfahren setzt voraus, dass die Alloxurkörper durch ammoniakalische Silberlösung vollständig niedergeschlagen werden. Wieweit diese Annahme zutrifft, darüber lassen sich zwar keine ziffermässige Angaben, machen; vermeidet man aber ein Uebermaass von Ammoniak, so wird der Fehler auf die möglich kleinste Grösse eingeschränkt. Wie gross die übrigen Fehler erwachsen können, ist aus der mittleren Abweichung der Parallelanalysen ersichtlich, welche bei meinen Bestimmungen des Alloxurkörperstickstoffs 0,3 mgr. oder 1,67% betrug. Nur in einem Sechstel der Fälle erreichte oder überstieg die Abweichung 0,5 mgr. Stickstoff. Die Höhe dieser Differenz vermindert sich mit fortschreitender Uebung; auch kann man so fehlerhafte Bestimmungen verwerfen. Im Allgemeinen darf man bei einem so complicirten Verfahren, wie das vorliegende ist, bis auf 2% übereinstimmende Resultate noch als recht wohl annehmbar bezeichnen.

Genauer lässt sich aussagen über die Fehlergrösse, welche bei der Bestimmung der Harnsäure eintreten kann. Ludwig hat in seinen Versuchen einen Verlust von 2% erlitten, wohl das überhaupt erreichbare Minimum. Was von der Harnsäure der Bestimmung entgeht, erscheint bei der Berechnung der Analyse als Xanthinbase. Nach den Bestimmungen Camerer's,¹⁾ die hier allein in Betracht kommen können, macht bei gemischter Kost der Stickstoff der Xanthinbasen 15,3% von dem der Alloxurkörper aus; auf die übrigen 84,7% ent-

¹⁾ Camerer, a. a. O. Bd. 28, S. 78.

fällt der Fehler in der Harnsäurebestimmung mit 1,694, und man würde demnach, wenn der Stickstoff der Xanthinbasen richtig 15,3%₀ betrüge, statt dessen 17%₀ finden, oder in der Bestimmung der Xanthinbasen einen Fehler von mindestens 10%₀ begehen können. Auf alle Fälle würde die Menge der Xanthinbasen zu gross gefunden werden.

Offenbar wären bei vergleichenden Bestimmungen sich ergebende Unterschiede nur dann von Bedeutung, wenn sie diese Fehlergrenze überschritten. In diese Fehlergrenzen werden die Resultate jedoch nur bei sorgfältiger Arbeit eingeschränkt, und ich habe darin den Anlass gesehen, das von mir befolgte Verfahren eingehend zu beschreiben.

Bedenken der Art gelten übrigens auch von anderen Methoden. Es ist kaum Aussicht vorhanden, dass eine andere bessere Resultate liefere.