

Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure auf Grund der Fällung als Ammonurat.

Von
E. Wörner.

Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.

(Der Redaction zugegangen am 19. November 1899.)

Die Hopkins'sche Bestimmung der Harnsäure erfreut sich mit Recht allgemeiner Beliebtheit, da sie bedeutend einfacher ist als die Ludwig'sche, ohne ihr an Genauigkeit nachzustehen; mit ihr hat sie aber den Uebelstand gemein, dass die Harnsäure als solche zur Abscheidung gebracht werden muss, um ihre Menge durch Wägung oder Bestimmung des Stickstoffgehaltes ermitteln zu können, was abgesehen von der langen Zeit, welche dadurch eine Bestimmung beansprucht, auch noch deshalb sehr misslich ist, weil die für Washwasser und Filtrat anzubringende Correctur je nach der Geschicklichkeit des Analytikers verschieden ausfallen wird, wodurch nicht unerhebliche Fehler bedingt werden können.

Hopkins¹⁾ selbst suchte die Abscheidung der Harnsäure als solche dadurch zu umgehen, dass er vorschlug, das Ammonurat mit Kaliumpermanganat zu titriren. Er erhielt hierbei auch befriedigende Ergebnisse. Diese Angabe bestätigten später eine Reihe von Autoren, so Cazé,²⁾ Ritter³⁾ und Folin;⁴⁾ aus deren Arbeiten geht aber auch hervor — Ritter³⁾ spricht es direkt aus —, dass das Erkennen der Endreaction ziemlich Übung erfordert und dass die Methode besonders dann keine Ersparniss bedeutet, wenn nur wenige Bestimmungen zur Ausführung gelangen, so dass auch jedesmal eine erneute

1) *Proceed. of the Lond. roy. Soc.* 52, 93; 1892.

2) *Sur le dosage de l'acide urique*. These de pharm. Lille 95. *Maly's Jahrb.* 1895, 80.

3) *Diese Zeitschrift*, Bd. XXI, S. 291; 1895.

4) *Diese Zeitschrift*, Bd. XXIV, S. 224; 1897.

Einstellung der Kaliumpermanganatlösung erforderlich wird. Die so wünschenswerthe Vereinfachung wird also nur in begrenztem Maasse erreicht.

Es lag nahe, nach einem Wege zu suchen, der eine direkte Bestimmung des Stickstoffgehaltes des Ammonurats ermöglichte. Da aber wenig Sicherheit für eine gleichmässige Zusammensetzung dieses Niederschlags geboten ist und zum Auswaschen desselben Ammonsulfat gebraucht wird, so musste auf alle Fälle das Ammoniak zuerst entfernt werden. Dies lässt sich nun leicht dadurch bewerkstelligen, dass man das Ammonurat in Natronlauge löst und dann das Ammoniak durch Erwärmen austreibt. Hierbei war allerdings mit der Möglichkeit zu rechnen, dass auch Harnsäurestickstoff verloren geht, da ja bekannt war, dass Harnsäure und verwandte Körper durch Erwärmen mit Alkalien, Baryt und dergleichen aufgespalten werden. Diese Bedenken mussten aber fallen, als durch E. Fischer's¹⁾ Untersuchungen über die Purinkörper festgestellt war, dass diese Spaltbarkeit ausserordentlich verschieden ist, je nach der Acidität der Verbindung, indem die Salzbildung hemmend auf die Verseifung einwirkt. E. Fischer²⁾ hat diese Verhältnisse auch quantitativ verfolgt und gefunden, dass aus der Harnsäure selbst bei 36 stündigem Erhitzen mit Normalkalilauge im geschlossenen Rohr nur sehr wenig Ammoniak abgespalten wird, so dass mit Sicherheit zu erwarten war, dass bei dem kurzen Erhitzen, welches nöthig ist, um das Ammoniak des Urates und Ammonsulfates auszutreiben, kein Verlust an Harnsäurestickstoff eintreten würde.

Dahingehende Versuche bestätigten diese Annahme vollständig. Ich glaube, von der Mittheilung der betreffenden Analysenbefunde absehen zu können. Damit war eine wesentliche Vereinfachung der Hopkins'schen Methode gegeben. Man hatte nur nöthig, das Ammonurat mit Ammonsulfatlösung chlorfrei zu waschen, um allen Harn zu entfernen, den Niederschlag in Natronlauge zu lösen, durch Erwärmen das Ammoniak

¹⁾ Zusammengefasste Berichte d. d. chem. Ges., Bd. XXXII, 435: 1899.

²⁾ Berichte d. d. chem. Ges., Bd. XXXII, 3266: 1899.

auszutreiben und dann nach Kjeldahl den Stickstoffgehalt der Harnsäure zu ermitteln.

Ehe die so abgeänderte Methode genau beschrieben werden soll, mögen noch einige Bemerkungen über die Fällung der Harnsäure als Urat hier Platz finden.

Während Hopkins¹⁾ ursprünglich vorgeschrieben hatte, 100 cem. Harn mit 30 g Ammonchlorid zu fällen, hatte Folin²⁾ später angegeben, dass die verschiedensten Ammonsalze und in erheblich geringeren Mengen eine genau so vollständige Fällung hervorrufen, und hatte empfohlen, die Fällung mit 10% eigem Ammonsulfat auszuführen. Bereits nach zwei Stunden sei dann alle Harnsäure als Urat abgeschieden. Er hat nach dieser Methode auch stets gut stimmende Werthe erhalten. Es lag aber bereits eine Mittheilung von A. Edmunds³⁾ vor, dass Ammonsulfat Harnsäure durchaus nicht so rasch und vollständig ausfällt, eine Beobachtung, die ich nur bestätigen kann. Folin⁴⁾ geht über Edmunds Angaben mit den Worten hinweg: Dies Resultat schien mir so wenig im Einklang mit dem, was bei der Natur der Reaction erwartet werden sollte, dass ich glaube, dasselbe bis auf Weiteres vernachlässigen zu können.

Wie Folin zu seiner Ansicht gekommen, ist nicht leicht einzusehen, da 10% Ammonsulfat die Harnsäure nur unter besonders günstigen Umständen einmal nach zwei Stunden völlig ausfallen werden. Lässt man derartige Filtrate noch länger stehen, so wird man in allen Fällen eine erneute Abscheidung von Ammonurat feststellen können, während sie sonst mehrere Tage völlig klar bleiben. Um diese Verhältnisse endgültig klar zu stellen, wurde eine Reihe von Harnen mit wechselnden Mengen von Ammonsulfat gefällt; da sich sofort ergab, dass hierbei die Fällung nicht so vollständig ist wie beim Füllen mit Salmiak, so wurden auch Harnen bei verschiedener Temperatur gefällt und stehen gelassen, um den Einfluss der letzteren festzustellen.

1) L. c.

2) L. c.

3) The Journal of Physiology 17 (1894—95), pag. 452.

4) L. c. pag. 239.

Die Bestimmung der Harnsäure geschah in oben angeführter Weise. Die so erhaltenen Werthe gibt nachstehende Zusammenstellung:

150 ccm. Harn.	Ammon- sulfat in %.	Harnsäure in mg.	Zeit in Stunden.	Tempe- ratur.
I.	10	8.4	2	15
	10	8.8	2	15
II	10	2.94	2	15
	10	5.46	2	15
	10	71.82	2	37
	10	81.90	2	37
III	10	78.12	6	15
	10	91.98	12	15
	10	92.82	12	37
	20	86.10	6	15
	20	79.80	6	15
	20	93.66	12	15
	20	89.88	12	37
IV.	10	81.48	24	15
	10	81.90	24	15
	10	74.34	24	37
	10	77.28	24	37
	20	67.60	3	15
	20	57.50	3	15
	20	85.68	24	15
	20	87.78	24	15
V.	30	98.70	$\frac{1}{2}$	15
	30	97.80	$\frac{1}{2}$	15
	30	100.8	2	15
	30	99.1	2	15

Es geht aus diesen Bestimmungen mit Sicherheit hervor, dass erst ein Zusatz von 30% Ammonsulfat die Harnsäure rasch und völlig zur Abscheidung bringt. Fällern und Stehenlassen bei höherer Temperatur beschleunigt zwar die Abscheidung, bedingt aber kleine Verluste.

Zugleich glaube ich aber durch diese Versuche auch die Bedenken Cazé's¹⁾ beseitigt zu haben, der bei Verwendung von Ammonsulfat zu hohe Werthe befürchtet, da auch Kreatinin und Xanthinkörper ausgefällt werden sollen. Unter normalen Verhältnissen wird eine Fällung dieser Körper nie zu befürchten sein. Auch die Angaben von Mehu²⁾ über die Fällung von Gallenfarbstoffen durch Ammonsulfat und die Versuche Crismer's,³⁾ der eine ausserordentlich grosse Menge von Körpern durch Ammonsulfat aussalzen konnte, dürfen ohne Weiteres nicht auf diese Verhältnisse übertragen werden.

Von dem Ammoniumchlorid hat das Ammonsulfat dagegen den Vorzug, dass es das Ammonurat als feinkörnigen Niederschlag ausfällt, der sehr leicht zu filtriren und auszuwaschen ist, während Ammoniumchlorid ein gallertiges Urat fällt, dessen Filtration und Auswaschen sehr zeitraubend ist; so gibt Ritter⁴⁾ an, dass er zum Chlorfreiwaschen in einigen Fällen zwei Tage benöthigt habe.

Dieser Uebelstand lässt sich leicht und völlig vermeiden, wenn man den Harn vor dem Fällern auf ungefähr 40–45° erwärmt. Man erhält dann ebenfalls einen krystallinischen Niederschlag, der zweckmässig in der Weise filtrirt wird, dass erst der Niederschlag aufs Filter gebracht wird und dann die Mutterlauge. Man erhält dann sofort ein klares Filtrat, während sonst oft wiederholtes Zurückgiessen nöthig wird.

Ein höheres Erwärmen empfiehlt sich nicht, da hierbei der Niederschlag oft zusammenklebt.

Ich habe die Fällung zum Schluss stets mit 20%

1) L. c.

2) Journ. de pharm. et de chem., Août 1878. Maly's Jahrb. 8, 269, 1878.

3) Maly's Jahrb. 21, 49, 1892.

4) L. c.

Ammonchlorid vorgenommen: es genügen wohl auch 10^o o, doch ist man mit 20^o o absolut sicher, alle Harnsäure zu erhalten.

Um etwas mehr Harnsäure zu bekommen und die Versuchsfehler etwas zu verringern, habe ich es zweckmässig gefunden, 150 cem. Harn zu einer Bestimmung zu verwenden. Dies hat auch noch den Vortheil, dass bei Uebungsanalysen mit Mischharnen eine einfache Multiplication mit zehn den Werth der Tagesmenge ergibt.

Die Ausführung einer Harnsäurebestimmung gestaltet sich nun folgendermaassen:

150 cem. Harn werden in einem Becherglase auf 40—45^o erwärmt und darin 30 g Chlorammonium aufgelöst. Der Niederschlag von Ammonurat wird nach $\frac{1}{2}$ —1stündigem Stehen filtrirt und mit 10^o oiger Ammonsulfatlösung chlorfrei gewaschen: dann wird er auf dem Filter in heisser 1—2^o oiger Natronlauge gelöst, das Filter mit heissem Wasser nachgewaschen und Filtrat und Waschwasser in einer Porzellanschale¹⁾ auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist. Die alkalische Harnsäurelösung wird in einen Kjeldahl-Kolben gespült, mit 15 cem. concentrirter Schwefelsäure und etwas Kupfersulfat zerstört und das gebildete Ammoniak in bekannter Weise bestimmt.

1 cem. $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure entspricht 0,0042 g Harnsäure.

Ich gebe in Nachstehendem die Werthe einer Reihe von Bestimmungen, die auf diese Weise in reinen Harnsäurelösungen und im Harn ausgeführt werden. Zum Vergleich wurde in denselben Proben auch die Harnsäure als solche aus dem Urat abgeschieden und deren Menge durch Bestimmung des Stickstoffgehaltes ermittelt. Die salzsaure Lösung wurde dabei immer möglichst genau auf 10 cem. eingedampft. Die Harn-

1) Diese Operation kann auch direkt in einem geräumigen Kjeldahl-Kolben ausgeführt werden, doch ist dann fortwährende Beaufsichtigung nöthig, da durch Schäumen leicht Verluste verursacht werden können. Es kann dann in demselben Kolben die ganze Bestimmung zu Ende geführt werden.

säurekrystalle wurden auf einem Filterchen von 3—3½ cm. Durchmesser gesammelt und das Auswaschen so geregelt, dass nie mehr wie 20—30 ccm. Wasser zum Chlorfreiwaschen nöthig waren, so dass den erhaltenen Werthen 1.5—2 mg Harnsäure zuzufügen waren.

Diese Correctur entspricht aber nicht den thatsächlichen Verhältnissen, da sicher mehr Harnsäure in Lösung bleibt. Folin¹⁾ hat das für reine Harnsäure bereits festgestellt: er fand 1 mg in 12.5 ccm. reinem Wasser: in salzsäurehaltigem Wasser war noch etwas mehr enthalten. Da die unreine Harnsäure, wie sie aus dem Ammonurat aus Harn zur Abscheidung gelangt, naturgemäss noch leichter löslich ist als reine Säure, so müssen dabei die Fehler noch etwas grösser werden. Ich glaube, dass man die nach der neuen Methode erhaltenen höheren Werthe zwanglos dadurch erklären kann. Die geringe Beimengung von Harnfarbstoff ist sicher nur von untergeordneter Bedeutung.

Die Mitfällung anderer Substanzen halte ich bei Verwendung von 20%igem Ammonchlorid als Fällungsmittel unter normalen Verhältnissen für ausgeschlossen. Der Ammonuratniederschlag ist auch mikroskopisch stets gleichmässig.

Bei Vergleichsbestimmungen mit reinen Harnsäurelösungen werden ebenfalls stets einige Milligramme mehr gefunden, wie bei der Abscheidung mit Salzsäure. Es wurde dabei stets der Stickstoffgehalt direkt ermittelt, dann andere Proben mit Ammonchlorid gefällt und die Harnsäure auf verschiedene Weise bestimmt.

Einige so erhaltene Werthe mögen hier folgen:

Es wurden erhalten Harnsäure in Milligrammen durch:

Direkte N-Bestimmung	Mit HCl abgeschieden	Neues Verfahren
99.96	95.58	97.86
84.00	80.46	82.74
49.44	46.94	47.88

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. XXIV, S. 230.

Die Werthe im Harn, die ich untenstehend mittheile, bilden das Mittel aus zwei Bestimmungen, die unter sich aber nur Abweichungen von 2—3 mg zeigten.

150 ccm. Harn ergaben Milligramme Harnsäure:

	Mit HCl abgeschieden	Direkte Bestimmung
1	103.9	105.8
2	105.5	107.1
3	62.40	67.20
4	63.06	68.46
5	61.98	65.10
6	78.36	82.11
7	67.40	70.98

Die Harnen waren durchweg normal.

Geringe Mengen von Eiweiss sind auf die Bestimmung ohne Einfluss, grössere wirken störend.

Ob in anderen pathologischen Harnen die Methode versagt, muss die Praxis erst ergeben.

Harnen mit Urat oder Phosphatsedimenten können ohne Weiteres zur Bestimmung benutzt werden.