

# Untersuchungen über Physiologie und Pharmakologie des Purinhaushaltes.

## III. Mitteilung.

### Die Bestimmung des Allantoins im Harn durch Titration.

Von

**Hans Handovsky**, Assistenten am Institut.

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. Februar 1914.)

Das nach Wiechowski<sup>1)</sup> durch Quecksilberacetat gefällte Allantoin wird so bestimmt, daß das im Allantoinquecksilberniederschlag quantitativ enthaltene Allantoin aus dem nach Kjeldahl untersuchten Stickstoff des Niederschlags berechnet, bzw. nach Entfernung des Quecksilbers auskristallisieren gelassen und gewogen wird. Es wäre nun, besonders wenn im Verlaufe von Stoffwechseluntersuchungen Serien von Versuchen nötig sind, sicher eine Vereinfachung der Methode, wenn es gelänge, das Allantoin durch Titration des zur Fällung verwendeten Quecksilbers zu bestimmen. Man könnte das vom Allantoin nicht gebundene Quecksilber des im Überschuß zugesetzten Reagens zurücktitrieren und aus dem gebundenen Teil das Allantoin berechnen oder den Niederschlag wieder lösen und darin das gebunden gewesene Quecksilber titrieren.<sup>2)</sup>

Dazu mußten folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Das Quecksilber muß als Acetat titrierbar sein.
2. Die Allantoinquecksilberverbindung muß konstant sein.

<sup>1)</sup> Vgl. Wiechowski, Hofmeisters Beitr., Bd. 11, S. 109, 1907. — Wiechowski, Biochem. Z., Bd. 25, S. 431, 1910. — In Neubauer-Huppert, Analyse des Harnes (Wiesbaden 1913).

<sup>2)</sup> Die bereits früher versuchte Titration des Quecksilbers im wieder gelösten Niederschlag ergab kleinere und weniger konstante Werte für die Allantoin-Quecksilberverbindung (Wiechowski, l. c.), als ich sie fand, wohl da der Niederschlag beim Auswaschen Quecksilber verliert (vgl. unten).

3. Es dürfen im Harnendfiltrat<sup>1)</sup> keine Substanzen sein, die die Titrierbarkeit des Quecksilbers stören.

Ad 1. Von den titrimetrischen Bestimmungsmethoden des Quecksilbers kamen zunächst zwei in Betracht; erstens die von Rupp<sup>2)</sup> angegebene jodometrische, nach der das Quecksilbersalz reduziert, das metallische Quecksilber vom Jod gebunden und das überschüssige Jod mit Thiosulfat zurücktitriert wird; zweitens die von Rupp und Krauss,<sup>3)</sup> wobei das Quecksilber als Nitrat mit Rhodanammon unter Verwendung von Eisenammoniakalaun als Indikator titriert wird.

Die jodometrische Methode hätte den Vorteil des scharfen Farbumschlags, erwies sich aber für unsere Zwecke als unbrauchbar, da die Titration des Quecksilberacetats bei der Reduktion mittels Formaldehyds nach der Ruppischen Vorschrift<sup>4)</sup> keine konstanten Werte ergab.

Wir untersuchten nun die Brauchbarkeit der zweiten Methode: Bekanntlich sind nicht alle Quecksilbersalze mit Rhodan titrierbar, es ist dies nur dann möglich, wenn sie stärker dissoziiert sind als das bei der Titration entstehende Rhodanid, was z. B. beim Chlorid nicht der Fall ist.<sup>5)</sup> Das Allantoinreagens von Wiechowski besteht aus 5<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Quecksilberacetat in 20<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Natriumacetat (vgl. l. c.). Es mußte zunächst untersucht werden, ob sich dieses Reagens in bezug auf seinen Quecksilbergehalt mit Rhodan titrieren läßt. Dazu wurde das Quecksilber einer bestimmten Menge Reagens auf zweifachem Wege bestimmt, erstens indem es mit Schwefelwasserstoff gefällt und als Sulfid gewogen wurde, zweitens durch Titration mit Ammoniumrhodanid.

25 ccm Reagens bildeten	0,0758 g HgS =	6,53 ccm $n_{10}$ -Hg
25 „ „ banden		6,54 „ $n_{10}$ -NH <sub>4</sub> SCN

<sup>1)</sup> Das endgültige zur Isolierung des Allantoins fertige Filtrat.

<sup>2)</sup> Archiv Pharm., Bd. 243, S. 300, 1905.

<sup>3)</sup> Berl. Berichte, Bd. 35, S. 2015, 1902.

<sup>4)</sup> Rupp (Berl. Ber., Bd. 40, S. 3276, 1907) schreibt für die Titration des Chlorids ein kräftiges, zwei Minuten langes Schütteln mit Formaldehyd vor; es scheint, daß sich das Acetat auch durch 10 Minuten währendes Schütteln nicht vollständig reduzieren läßt.

<sup>5)</sup> Rupp und Krauss, l. c.

Es läßt sich also das Quecksilber im Reagens durch Titration mit Rhodan quantitativ bestimmen.

Ad 2. Es wurde nun weiter so vorgegangen, daß gewogene Mengen Allantoinum puriss. Merck in Wasser gelöst und mit einem gemessenen Überschuß Reagens versetzt wurden. Nach etwa einer halben Stunde wurde vom Niederschlag abfiltriert und in einem aliquoten Filtratteil das Quecksilber durch Titration bestimmt. Die gefundene Menge Quecksilbers wurde auf das Ausgangsvolumen berechnet und von der zugesetzten abgezogen; die Differenz ergab die Menge des vom Allantoin gebundenen Quecksilbers, dabei zeigte sich, daß gleiche Mengen Allantoin gleiche Mengen Quecksilbers banden. Das Verhältnis  $n/10$ -Quecksilber :  $n/10$ -Allantoin (in Hinkunft Q genannt) war in den folgenden fünfzehn Versuchen:

3,66	3,63
3,64	3,63
3,64	3,60
3,60	3,63
3,61	3,63
3,61	3,58
3,64	3,67
3,54	
	54,31 : 15 = 3,62

Es bindet also ein Mol. Allantoin 3,62 Äquivalente Quecksilber. Die Verbindung hätte daher annähernd die Zusammensetzung 5 Allantoin + 9 HgO, die mit keiner der bekannten identisch ist; die Verbindung mit Quecksilberoxyd ist in wässriger Lösung 3 Allantoin + 2 HgO, die mit Quecksilbernitrat 4 Allantoin + 5 HgO.<sup>1)</sup>

Aus dem obigen Quotienten  $Q = \frac{\text{ccm } n/10\text{-Hg}}{\text{ccm } n/10\text{-Allantoin}}$  oder in Grammen

Allantoin (M.-G. = 158)  $Q = \text{ccm } n/10\text{-Hg} \cdot \frac{0,0158}{\text{g Allantoin}}$  ergibt sich zunächst für die Berechnung, daß man die abgelesene Zahl ccm  $n/10\text{-NH}_4\text{SCN}$  mit  $0,0158 : 3,62 = 0,00436$  multiplizieren muß, um die Menge Allantoin in Grammen zu erfahren. Außerdem erhellt aus obiger Berechnung, daß die Fehler bei der Berechnung des Quotienten Q um so kleiner sind, je größere Mengen Allantoin untersucht werden; in den obigen Versuchen

<sup>1)</sup> Vgl. Wiechowski (Huppert, S. 1071).

wurden immer 0,1 g Allantoin in ca. 100 ccm Wasser gelöst, mit 100 ccm Allantoinreagens versetzt auf 250 ccm aufgefüllt; 100 ccm des Filtrats wurden titriert.

Für die praktische Verwertbarkeit der Allantoinbestimmung durch die Quecksibertitration mußte noch untersucht werden, ob der Natriumacetatzusatz belanglos, ob ferner die Konstanz der Quecksilberallantoinverbindung von dem Verhältnis der Quecksilber- zur Allantoinmenge unabhängig ist.

Es wurden folgende Versuche gemacht:

1. Gleiche Allantoinmengen wurden mit verschiedenen Mengen Reagens versetzt und auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

2. Gleiche Allantoinmengen wurden mit gleichen Mengen Reagens versetzt und das eine Mal mit Wasser, das andere Mal mit 20%iger Natriumacetatlösung auf verschiedene Volumina aufgefüllt.

In allen Fällen ergab sich für die Quecksilber-Allantoinverbindung der empirische Quotient 3,62.

Zu den unter 1) erwähnten Versuchen muß daran erinnert werden, daß Wiechowski ausdrücklich darauf hinweist (l. c.), daß Allantoinreagens im Überschuß zugesetzt werden muß, da sich sonst der gebildete Allantoinquecksilberniederschlag zum Teil wieder auflöst; selbstverständlich erhält man dann zu niedrige Quotienten (3,16; 3,38).

Ad 3. Jetzt konnte daran gegangen werden, die Quecksilber-Allantoinverbindung im Harn von denselben Gesichtspunkten aus zu untersuchen. Dabei ergab sich die Notwendigkeit einiger Modifikationen.

Die bei der Bestimmung des Quecksilbers im Reagens in wässriger Lösung möglich gewesene Entfärbung des Eisensalzes durch Salpetersäure, wie es dem allgemein üblichen Verfahren entspricht, erwies sich im Harn in den meisten Fällen als unbrauchbar, da im Harnendfiltrat oft mit Salpetersäure braun färbbare Substanzen enthalten sind. Wir versuchten es dann mit verdünnter Schwefelsäure.

Die Verwendung von verdünnter Schwefelsäure zur Entfärbung des Eisensalzes hatte auf die Titration

des Reagens in wässriger Lösung keinen Einfluß, besonders bei reichlichem Indikatorzusatz, nur der Farbumschlag war etwas weniger scharf.

Auch im Harnendfiltrat läßt sich das Reagens auf diese Weise ebenso titrieren, wie in wässriger Lösung; diese Versuche wurden so gemacht, daß zu 50 ccm Harnendfiltrat 50 ccm Reagens zugesetzt und der Niederschlag durch Auffüllen mit verdünnter Schwefelsäure auf 150 ccm gelöst wurde. — Wird das Reagens längere Zeit mit dem Harn stehen gelassen, dann wird das Quecksilber teilweise reduziert, was natürlich das Titrationsergebnis beeinträchtigen muß. Es soll daher die Titration bald nach der Mischung des Endfiltrats mit dem Reagens vorgenommen werden.

Nun konnte daran gegangen werden, zu untersuchen, ob auch die aus dem Harn gefällte Allantoinquecksilberverbindung konstant ist bzw. dieselbe Zusammensetzung hat wie in wässriger Lösung. Da stellte sich heraus, daß dies in dem mit  $Mg(OH)_2$  alkalisch gemachten Endfiltrat (vgl. Wiechowski, l. c.) nicht der Fall war; die Quotienten waren unkonstant und zu groß (4,98: 5,52; 9,84). — Wurde jedoch das essigsäure Harnendfiltrat mit  $CaCO_3$  neutralisiert, dann bekam ich konstante Werte für die Zusammensetzung des Allantoinquecksilbers und zwar die gleichen wie in der wässrigen Lösung. Diese Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Es wurden erstens 50 ccm Harnendfiltrat mit 100 ccm Reagens versetzt, mit verdünnter Schwefelsäure auf 250 ccm aufgefüllt, wobei sich der Niederschlag löste, und davon 100 ccm titriert; zweitens wurden 50 ccm Harnendfiltrat mit 100 ccm Reagens versetzt auf 250 ccm aufgefüllt, der Niederschlag abfiltriert und 100 ccm des Filtrats titriert; daraus ergab sich, wieviel Reagens der Harn zu binden vermag; drittens wurden 50 ccm Harnendfiltrat mit 300 ccm Reagens versetzt und mit einer stets durch frisches Einwiegen gewonnenen 0,1 g Allantoin enthaltenden Allantoinlösung auf 500 ccm aufgefüllt; der Niederschlag wurde wieder abfiltriert und 100 ccm des Filtrats titriert; daraus erfährt man, wieviel Kubikzentimeter Quecksilber der Harn + 0,1 g Allantoin zu binden vermag, aus der Subtraktion des Wertes des zweiten Versuchs,

wieviel 0,1 g Allantoin im Harn an Quecksilber bindet. Es ergab sich, daß auch im Harnendfiltrat die Allantoin-quecksilberverbindung konstant ist und zwar, daß 1 Mol. Allantoin 3,62 Äquivalente Quecksilber bindet.

Sechs Versuche ergaben folgende Werte für Q:

3,60  
3,50  
3,65  
3,76  
3,65  
3,62

$$21,78 : 6 = 3,63.$$

Entsprechend den ungünstigeren Bedingungen liegen hier die Werte etwas mehr auseinander als in der wässrigen Lösung. Doch ergaben auch Kontrollbestimmungen des Allantoins im Harn mittels der Stickstoffbestimmung und der Rhodantitration, die zum größten Teil Herr Dr. H. Yanagawa die Liebenswürdigkeit hatte auszuführen, eine sehr gute Übereinstimmung.

Es enthielten Tagesmengen Kaninchenharn an Allantoin (verschiedene Fütterung):

a) bestimmt mittels der Rhodantitration unter Zugrundelegung des Quotienten  $Q = 3,62$ :

1.	0,122 g
2.	0,090 „
3.	0,056 „
4.	0,055 „
5.	0,126 „
6.	0,104 „
7.	0,150 „
8.	0,122 „
9.	0,065 „
10.	0,039 „
11.	0,047 „
12.	0,047 „
13.	0,050 „
14.	0,052 „
15.	0,046 „
16.	0,044 „
17.	0,039 „

b) bestimmt mittels der Stickstoffbestimmung des Allantoinniederschlags nach Kjeldahl:

	0,123 g
	0,089 „
	0,057 „
	0,058 „
	0,127 „
	0,110 „
	0,162 „!
	0,123 „
	0,065 „
	0,033 „
	0,052 „
	0,049 „
	0,056 „
	0,054 „
	0,051 „
	0,046 „
	0,041 „

Die Abweichung beider Werte ist somit — ohne Berücksichtigung von Versuch 7 — durchschnittlich 2,8 mg. Dabei ist zu bemerken, daß bei den Harnen 1—9 die Tagesmenge ca. 40 ccm, in den übrigen etwa 100 ccm betrug; in den letzten Fällen konnte nur ein Teil verarbeitet werden, wodurch der Titrationsfehler im Endresultat multipliziert erscheint. Was eine Diskussion der beiden Methoden anlangt, so enthält der Niederschlag stets Quecksilber bindende, wahrscheinlich an Stickstoff unverhältnismäßig reichere Verunreinigungen (vgl. Wiechowski, l. c.), worauf es zurückzuführen sein dürfte, daß bei der Bestimmung aus dem Stickstoffgehalt stets etwas höhere Werte beobachtet wurden; andererseits aber muß erwähnt werden, daß beim Auswaschen des Niederschlags bis zur Harnstofffreiheit etwas von dem Niederschlag in Lösung gehen muß. Die durch Rhodantitration gefundenen Werte sind also objektiv die richtigeren.

Besonders hervorzuheben sind noch zwei Möglichkeiten, die die Titrierbarkeit des Quecksilberüberschusses im Harn beeinflussen:

1. Die Chlorionen: Es ist bekannt, daß Chlorionen die Titrierbarkeit des Quecksilbers mittels Rhodanammonium unmöglich machen, da sie stets zu kleine Werte entstehen lassen (vgl. oben); dasselbe gilt auch im Harn.

2. Ein Überschuß von Harnstoff: Wiechowski (l. c.) wies darauf hin, daß ein Überschuß an Harnstoff den Allantoinquecksilberniederschlag löst; wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht, ist eine 1%ige Harnstofflösung ohne Einfluß, während in einer 2%igen nur 93%, in einer 3%igen nur 80% Allantoin ausfielen.

Wirklicher Allantoingehalt g	Harnstoffgehalt %	Gemessener Allantoingehalt g
0,1020	—	0,1020
0,1020	1	0,1021
0,1020	2	0,0995
0,1020	3	0,0816

Zum Schluß sei es gestattet, die Methode der Allantoin-darstellung nochmals im Zusammenhang auseinanderzusetzen:<sup>1)</sup>

1. Der Harn wird auf 1% Harnstoff verdünnt und, falls er alkalisch ist, neutralisiert; da der Kaninchenharn in der Tagesmenge ca. 1—2 g N, d. i. 2—4 g Harnstoff enthält, also bei Hafertieren eine ca. 4%ige Harnstofflösung darstellt, empfiehlt es sich, ihn drei- bis vierfach zu verdünnen; eine noch stärkere Verdünnung ist nicht anzuraten, da sonst natürlich infolge der Multiplikation des Titrationsresultates auch der Titrationsfehler vervielfacht wird. Der Harn wird dann mit 1% iger  $H_2SO_4$  und pro Tagesmenge 3 ccm Eisessig versetzt.

2. Ein großer Teil, etwa zwei Drittel, des verdünnten und angesäuerten Harns wird mit der vorher ausgetasteten Menge Phosphorwolframsäure in Substanz ausgefällt; der Niederschlag muß bei vollständiger Ausfällung weiß sein, eventuell muß man einige Zeit warten.

3. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird durch ein Kieselgurfilter, das man mit einigen Kubikzentimetern des in Untersuchung stehenden Harns anmacht, abgenutscht. Die überschüssige Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure werden mit Bleioxyd entfernt; dabei geht man am besten und schnellsten so vor, daß man zum Bleioxyd zunächst ein wenig vom Filtrat zusetzt und durch Rühren die Reaktion (Bildung von Bleiacetat) in Gang bringt, was man daran erkennt, daß sich die Flüssigkeit erwärmt; dann erst gießt man den Rest des Filtrates nach. Der Prozeß ist vollendet, wenn die Flüssigkeit infolge der Bildung von basischem Bleiacetat alkalisch reagiert.

4. Hierauf wird wieder abgenutscht; das Filtrat darf mit basischem Bleiacetat keinen Niederschlag geben. Dann werden die Chlorionen, falls solche vorhanden sind, entfernt, da sie sowohl den Allantoinquecksilberniederschlag lösen, als insbesondere schon in Spuren die Titration mit Rhodan stören. Das gemessene Volumen Bleifiltrats wird zu diesem Zwecke

---

<sup>1)</sup> Wiechowski hat diese Methode in dieser Form zum ersten und einzigen Male in Hupperts «Analyse des Harns» (vgl. oben) publiziert; auf seinen Wunsch ist sie hier mit den inzwischen hinzugekommenen Modifikationen noch einmal zusammengestellt.

mit einer gemessenen Menge Eisessig und Silberacetat oder -nitrat bis zur vollständigen Ausfällung versetzt und der Chlorsilberniederschlag, zweckmäßig durch Kieselgur, abgesaugt.

5. Das überschüssige Blei, resp. Silber wird mit Schwefelwasserstoff quantitativ gefällt, der Sulfidniederschlag abgenutscht.

6. Der Schwefelwasserstoff wird dann durch Luft vollständig ausgetrieben, was mittels eines Bleiacetatpapiers nachgewiesen wird.

7. Das essigsäure Endfiltrat wird mit  $\text{CaCO}_3$  neutralisiert, die absorbierte Kohlensäure durch Luft entfernt.

8. Das nunmehr neutrale Endfiltrat wird mit der vorher ausgetasteten Menge Allantoinreagens versetzt und auf ein rundes Volumen aufgefüllt. Das Reagens besteht, wie schon oben gesagt wurde, aus 5<sup>0/100</sup> Quecksilberacetat und 20<sup>0/100</sup> Natriumacetat; eine stärkere Quecksilberlösung würde auch den Harnstoff fällen, Weglassen des Natriumacetats infolge der dann sauern Reaktion den Niederschlag teilweise lösen. Es empfiehlt sich, das Reagens öfter zu filtrieren. Es muß stets im Überschuß zugesetzt werden, so daß das Filtrat nie mit dem Reagens, wohl aber sofort mit Allantoin einen Niederschlag gibt. Nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde — man soll nicht zu lange warten! (vgl. oben) — wird die Flüssigkeit filtriert.

9. Ein abgemessener Teil des Filtrats wird mit ca. 10 ccm Eisenammoniakalaun versetzt und die rote Lösung mit verdünnter Schwefelsäure entfärbt; die Flüssigkeit wird nie ganz farblos, sondern sie behält einen schwach grünlichen Schimmer; hierbei meist ausfallendes Calciumsulfat stört nicht; es wird dann mit einer  $\frac{n}{10}\text{-NH}_4\text{SCN}$ -Lösung bis zum Auftreten einer gelben, durch Hinzufügen von 1—2 Tropfen immer intensiver werdenden Färbung titriert. Die genaue Erkennung des Umschlags der Farbe erfordert einige Übung, auch ist es nicht zu empfehlen, bei künstlichem Licht zu titrieren. Natürlich muß die Rhodanlösung hie und da gegen eine  $\frac{n}{10}$ -Silbernitratlösung gestellt werden, ebenso ist es unbedingt nötig, die Zusammensetzung des Reagens durch Titration zu kontrollieren.

10. Die Menge der verbrauchten  $\frac{n}{10}\text{-NH}_4\text{SCN}$ -Lösung in Kubikzentimetern multipliziert mit 0,00436 (d. i. 0,00158 : 3,62)

ergibt das in der zur Titration verwendeten Menge vorhandene Allantoin in Grammen. Der Titrationsfehler beträgt also für 0,1 ccm  $n_{/10}$ - $\text{NH}_4\text{SCN}$  0,0004 g Allantoin; da sich dieser Fehler bei Umrechnung auf die Tagesmenge Harn vervielfacht, fallen beim physiologischen Experiment Unterschiede im Allantoingehalt von 5 mg in die Fehlergrenzen.

#### Beispiel einer Berechnung:

50 ccm Harn werden mit Wasser, 1,5 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 3 ccm Eisessig auf 150 ccm aufgefüllt; diese werden nach 1—3 behandelt, dann werden zur Entfernung des Chlors zu 120 ccm Bleifiltrat noch 10 ccm Eisessig und 40 ccm Silberacetat zugesetzt; dann wird weiter nach 5—7 vorgegangen. 100 ccm des Endfiltrats werden dann mit 100 ccm Reagens behandelt; diese 200 ccm werden filtriert und vom Filtrat je 50 ccm zu einer Titration verwendet.

50 ccm Filtrat binden 4,8 ccm  $n_{/10}$ - $\text{NH}_4\text{SCN}$ ; das ganze Filtrat  
 = 200 » bindet 19,2 » ; zugesetzt waren  
 100 » Reagens = 34,6 »  $n_{/10}$ -Hg; von den 100 ccm des Endfiltrats werden daher gebunden 34,6 ccm  
 — 19,2 »  
 15,4 ccm  $n_{/10}$ -Hg;

diese 100 ccm Endfiltrat enthalten von den ursprünglichen 50 ccm Harn

$$50 \times \frac{120}{150} \times \frac{100}{170} \text{ ccm} = 50 \times \frac{8}{17} \text{ ccm}:$$

die 50 ccm Harn binden also  $15,4 \times \frac{17}{8} = 32,7$  ccm  $n_{/10}$ -Hg, sie enthalten daher  $32,7 \times 0,00436 = 0,142$  g Allantoin.

Da hier die Menge der zur Titration verwendeten Flüssigkeit zirka ein Achtel der gesamten Menge Harns beträgt, ist der Titrationsfehler in diesem Beispiel  $8 \times 0,000436 \text{ g} = 0,0034$  g Allantoin.