

(Aus dem physiologischen Laboratorium in Bonn.)

Zur Methodik der Harnstoffbestimmung im normalen und zuckerhaltigen Harn.

Von

Bernhard Schöndorff.

Gegen die von Pflüger und L. Bleibtreu¹⁾ für den Harn angegebene und von mir²⁾ auf Veranlassung von Herrn Professor Pflüger zur allgemeinen Bestimmung in thierischen Organen und Flüssigkeiten weiter ausgearbeitete Methode der Harnstoffanalyse durch Erhitzen mit Phosphorsäure nach vorheriger Ausfällung der anderen stickstoffhaltigen Körper durch Phosphorwolframsäure-Salzsäure ist in neuerer Zeit eine Reihe von Einwendungen gemacht worden, die mir Veranlassung geben, näher auf dieselben einzugehen und festzustellen zu suchen, ob dieselben berechtigt sind.

1. Die angebliche Complicirtheit der Methode.

Was die Vorwürfe³⁾ betrifft, die man der Methode macht, dass sie an Schnelligkeit der Ausführung zu wünschen übrig liesse, und dass sie zu complicirt und desshalb für klinische Zwecke wenig brauchbar sei, so ist darauf zu erwidern, dass es auch für klinische Zwecke zunächst darauf ankommt, dass eine Methode exact und genau sei, und diese Eigenschaften werden von Allen, die die Methode angewandt haben, anerkannt.

Die Phosphorsäuremethode ist doch schliesslich nur eine modificirte Kjeldal'sche Stickstoff-Bestimmungsmethode, die heutzutage doch jeder nur einigermaassen im chemischen Arbeiten erfahrene Mediciner ausführen kann. Jedenfalls habe ich die Erfahrung gemacht, dass die Praktikanten dieselbe sehr schnell erlernten und

1) E. Pflüger und L. Bleibtreu, Pflüger's Arch. Bd. 44 S. 78.

2) B. Schöndorff, Pflüger's Arch. Bd. 62 S. 1.

3) Freund und Töpfer, Wiener klin. Rundschau 18. Jahrg. Nr. 23 S. 371. 1899. — F. Erben, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 38 S. 549. 1903.

dieselben selbstständig ausführen konnten. Sie nimmt natürlich, wie jede quantitative Analyse, eine gewisse Zeit in Anspruch und beansprucht eine gewisse Erfahrung im chemischen Arbeiten; aber sie bietet auch den Vortheil, dass man ebenso wie bei der Kjeldal'schen Methode eine Reihe von Analysen neben einander machen kann, dass die Analyse, nachdem die Fällung mit Phosphorwolframsäure-Salzsäure geschehen, während des Erhitzens mit Phosphorsäure auf 150°C. , wenigstens bei Anwendung des von Pflüger und L. Bleibtreu angegebenen grossen Trockenschranks, kaum einer Ueberwachung bedarf und nur das Abdestilliren des Ammoniaks beaufsichtigt werden muss. Ich habe viele Monate hindurch täglich im Hundeharn Kjeldal'sche Stickstoffbestimmungen und Harnstoffbestimmungen nach der Phosphorsäuremethode ausgeführt, und dies hat meine Zeit nicht so viel in Anspruch genommen, dass ich nicht noch eine Reihe anderer Arbeiten nebenbei habe erledigen können. Die Methode bietet auch den Vortheil, dass sie nicht sofort zu Ende geführt werden braucht. Die Fällung mit Phosphorwolframsäure-Salzsäure kann längere Zeit stehen, ohne dass sich der Harnstoff verändert; die Kölbchen mit phosphorsaurem Ammoniak können, ebenso wie bei der Kjeldal'schen Analyse die oxydierten Kölbchen, längere Zeit aufbewahrt werden, wenn man nur dafür Sorge trägt, dass die Kolben gut verschlossen sind und von aussen kein Ammoniak herein gelangen kann. Ein Beweis dafür, dass die Methode auch für klinische Zwecke brauchbar ist, ist der, dass sie in einer Reihe medicinisch-chemischer Laboratorien, wie Nencki, Salaskin, v. Jacksch, v. Noorden, Huppert, Heubner usw., angewendet worden ist.

2. Die Fällbarkeit des Harnstoffes durch Phosphorwolframsäure.

Bekanntlich beruht die Phosphorsäuremethode darauf, dass man die neben Harnstoff vorkommenden stickstoffhaltigen Körper durch Phosphorwolframsäure-Salzsäure fällt, in dem durch Ca(OH)_2 neutralisirten Filtrat den Harnstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäure zerlegt und das gebildete Ammoniak bestimmt.

Nun ist gegen die Anwendung der Phosphorwolframsäure von Mörner¹⁾ und Folin²⁾ behauptet, dass die Phosphorwolframsäure Harnstoff fälle und desshalb die Methode unbrauchbar sei.

1) K. Mörner, Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 2 S. 466. 1891, Bd. 14 S. 330. 1903.

2) O. Folin, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 32 S. 509. 1901.

Gewiss, es gibt Phosphorwolframsäuren, die Harnstoff auch schon aus verdünnten Lösungen fällen, aber diese darf man dann nicht anwenden. Darauf ist es auch zurückzuführen, dass Pflüger und Bohland¹⁾, die die Phosphorwolframsäure zuerst in die Harnstoffanalyse einführten, ganz besonders vorschreiben, dass man die anzuwendende Phosphorwolframsäure daraufhin untersuchen müsse, dass sie in reinen Harnstofflösungen von 2—4 ‰, auch bei längerem Stehen keine Fällung gebe.

Als ich seiner Zeit die für den Harn bewährte Phosphorsäuremethode zur Bestimmung des Harnstoffes in thierischen Organen und Flüssigkeiten ausarbeitete, sagte ich ausdrücklich: man muss die Phosphorwolframsäure vorher daraufhin untersuchen, ob sie Harnstoff fällt. Es hatte sich nämlich herausgestellt, dass auch die von derselben Firma bezogenen Phosphorwolframsäuren in ihren Wirkungen verschieden sind. Während Pflüger und L. Bleibtreu von Kahlbaum-Berlin eine Phosphorwolframsäure erhalten hatten, die Harnstoff nicht und Ammoniak nur unvollständig fällte, so dass sich eine Bestimmung des präformierten Ammoniaks im Phosphorwolframsäurefiltrat als nothwendig erwies, lieferte uns Kahlbaum später eine Säure, die Harnstoff nicht fällte, aber Ammoniak vollständig ausfällte.

Als ich dann später für meine Untersuchung über die Stickstoffvertheilung im Harne bei verschiedener Ernährung neue Phosphorwolframsäure von Kahlbaum nöthig hatte, lieferte er jetzt eine Säure, die schon mit verdünnten Harnstofflösungen Fällungen gab. Auch die von anderen Fabriken bezogene Säure hatte dieselbe Harnstoff fällende Eigenschaft. Erst E. Merck in Darmstadt lieferte uns dann eine Phosphorwolframsäure, die stickstofffrei war, keinen Harnstoff, aber Ammoniak vollständig fällte. Um sicher zu gehen, dass kein Harnstoff im Harn gefällt wird, ist es zweckmässig, concentrirte Harne mit hohem Harnstoffgehalt auf das 5—10fache zu verdünnen. Auch Camerer²⁾ und Pfaundler³⁾ haben dieselbe Säure von Merck bezogen.

Es ist übrigens nicht zu verwundern, dass es Phosphorwolframsäuren mit verschiedenem Wirkungswerth gibt, da ja bekanntlich

1) E. Pflüger und K. Bohland, Pflüger's Arch. Bd. 38 S. 578—585.

2) W. Camerer, Zeitschr. f. Biol. Bd. 46 S. 340. 1905.

3) Pfaundler, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 30 S. 79. 1900.

die Phosphorwolframsäuren Polysäuren sind, bei denen auf 1 Mol. Phosphorsäure die verschiedenste Anzahl Moleküle Wolframsäure kommen kann, die sich aber auch noch durch die verschiedenen Arten der Darstellungsweise unterscheiden.

Dammer¹⁾ führt in seinem grossen Handbuch der anorganischen Chemie allein 15 verschiedene Phosphorwolframsäuren an. Auf 1 Mol. P_2O_5 können 7, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 32 Mol. WO_3 kommen. Unter den allgemeinen Eigenschaften der Phosphorwolframsäuren führt er an: „Sie schmecken meist bitter und geben sehr wenig lösliche Fällungen mit Alkaloiden, Harnstoff, Albumin“ u. s. w.

Man ersieht daraus, wie sehr man bei der Anschaffung der Phosphorwolframsäure aufpassen muss, und ich kann nur das wiederholen, was auch schon Pflüger und Bohland bei der Einführung der Phosphorwolframsäure in die Harnanalyse gesagt haben: dass man sich vor dem Gebrauch bei jeder Phosphorwolframsäure davon überzeugen muss, dass sie in 2—4% Harnstofflösungen auch bei längerem Stehen keine Fällung gibt. Und für concentrirte Harne ergibt sich daraus die Nothwendigkeit, dieselben eventuell auf das 5—10fache zu verdünnen und dann erst die Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung zuzusetzen. Man kommt dann in den meisten Fällen mit 2 Volumina Säuremischung auf 1 Volumen Harn aus. Mörner²⁾ gibt ja auch schliesslich zu, dass seine früheren Einwendungen gegen die Anwendung der Phosphorwolframsäure wegen ihrer Fällbarkeit des Harnstoffes nicht mehr stichhaltig sind, nachdem er sich selbst eine Phosphorwolframsäure nach den Angaben von S. Hedin hergestellt hat, die keinen Harnstoff fällte.

Er hat mit dieser Phosphorwolframsäure Versuche in der Art ausgeführt, dass er Harne mit Wasser verdünnte, mit Phosphorwolframsäure fällte und im Filtrat den Stickstoff nach Kjeldal bestimmte. Ein anderer Theil des Harnes wurde mit ebenso viel von einer Harnstofflösung als die ersterwähnte Probe mit Wasser versetzt, worauf mit derselben Menge der salzsäurehaltigen Phosphorwolframsäure gefällt und der Harnstoff nach der Phosphorsäuremethode bestimmt wurde. Der Harnstoffgehalt der Mischungen betrug 1—2 %.

1) O. Dammer, Handbuch der anorganischen Chemie Bd. 3 S. 648—654. Stuttgart 1893.

2) K. Mörner, Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 14 S. 333. 1903.

Zur Orientirung des Lesers, und damit derselbe in der Lage ist, selbst den Werth der Phosphorsäuremethode zu beurtheilen, füge ich die Tabelle VII aus Mörner's Untersuchung S. 333 bei, indem ich noch bemerke, dass die Säure A eine Säure war, von der Mörner wusste, dass sie Harnstoff fällte. Säure B war von derselben Fabrik bezogen und Säure C von ihm selbst dargestellt.

Tabelle I.

Bezeichnung der Phosphor- wolfram- säure	1	2	3	4
	Nach dem Fällen mit Phosphor- wolframsäure. N in 100 ccm Harn	Der mit Harnstoff versetzte Harn. N in 100 ccm nach Spalte 1 berechnet	Der Harn mit Harnstoff versetzt, nach dem Fällen mit Phosphorsäure gefunden. N in 100 ccm	Differenz zwischen Spalte 2 und 3. Verlust an zugesetztem Harnstoff in Prozenten von diesem
A. ¹⁾	0,120	1,477	1,272	— 15,0
B.	0,530 0,537 0,512	0,808 1,003 0,976	0,806 1,002 0,967	— 0,2 — 0,1 — 1,0
C.	0,533 0,523 0,512 0,503 0,116 0,123	1,009 0,989 0,978 0,969 0,582 0,589	1,003 0,986 0,966 0,960 0,575 0,581	— 0,6 — 0,3 — 1,2 — 1,0 — 1,2 — 1,3

Berechnet man aus den Differenzen in Spalte 4 das Mittel der mit Säure B und C angestellten Versuche, indem ich den mit Säure A angestellten Versuch wegen ihrer harnstofffällenden Eigenschaft weglasse, so ergibt sich also als Differenz zwischen dem berechneten und gefundenen Werth für den Harnstoff-Stickstoff im Mittel aus neun Versuchen — 0,78 %, eine Zahl, die als innerhalb des Bereichs des Beobachtungsfehlers liegend angesehen werden muss, wenn man bedenkt, dass der Harnstoff 46,67 % N enthält. Trotzdem sagt Mörner betreffs des Ausfalles dieser Versuche:

„In dem ersten Versuche, mit dem höheren Harnstoffgehalt, wurde die Ausfällung des Harnstoffes durch Phosphorwolframsäure¹⁾ augenscheinlich durch die Gegenwart von den fällbaren Harnbestandtheilen begünstigt. In den anderen Versuchen, bei einem Harnstoff-

1) Säure mit harnstofffällender Eigenschaft.

gehalt von 1—2 %, war dies nicht oder doch nicht in nennenswerthem Grade der Fall. Diese Verwendung der von mir bereiteten Phosphorwolframsäure, welche in der oben angegebenen Weise dargestellt wird, scheint bei diesem Harnstoffgehalt nicht bedenklich zu sein, vorausgesetzt nämlich, dass der im Harn von Anfang an vorhandene Harnstoff sich in dieser Hinsicht ebenso verhält wie der zugesetzte.“¹⁾

Nachdem er also den zugesetzten Harnstoff vollständig, wenigstens innerhalb des Bereiches des Beobachtungsfehlers, wiedergefunden hat, macht er jetzt den Einwand, dass der im ursprünglichen Harn vorhandene Harnstoff sich vielleicht nicht so verhielt wie der zugesetzte.

Versuche mit demselben Harn, einmal unverdünnt, einmal mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, ergaben fast dieselben Werthe — der verdünnte um 2,5 % mehr —.

Der unbefangene Leser wird aber wohl aus dieser Auseinandersetzung ersehen, dass auch aus den Versuchen Mörner's hervorgeht, dass seine Phosphorwolframsäure keinen Harnstoff fällen und die Phosphorsäuremethode richtige Werte für den Harnstoff gibt.

3. Ueber die Menge der anzuwendenden Phosphorsäure.

Pflüger und L. Bleibtreu schreiben in ihren Vorschriften für die Phosphorsäuremethode die Anwendung von ungefähr 10 g krystallisirter Phosphorsäure vor, weil diese Menge in allen Fällen genüge, um den Harnstoff vollständig zu zersetzen. Es verhält sich mit der Anwendung derselben Menge Phosphorsäure in allen Analysen genau so wie mit der Anwendung derselben Menge Schwefelsäure bei der Kjeldal'schen Analyse, trotzdem man sicherlich in manchen Fällen mit weniger Schwefelsäure eine vollständige Oxydation herbeiführen kann.

Nun behauptet v. Jacksch²⁾, dass man mit bedeutend weniger Phosphorsäure (3—5 g) auskommen könne, um allen Harnstoff zu zersetzen.

Zu welchen Irrthümern dies Veranlassung geben kann, hat v. Jacksch nun bei seinen eigenen Versuchen erfahren.

Er hat bei seiner im Jahre 1902 publicirten Untersuchung über die Stickstoffvertheilung im Harne bei verschiedenen Erkrankungen

1) Von mir gesperrt gedruckt.

2) v. Jacksch, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 47 S. 66. 1902, Bd. 50 S. 1. 1903.

in seinen Harnstoffanalysen statt der vorgeschriebenen 10 g krystallisirter Phosphorsäure 10 ccm einer 10%igen Lösung von krystallisirter Phosphorsäure angewandt und muss am Schlusse seiner Publication¹⁾ sagen, dass seine sämtlichen Harnstoffzahlen falsch sind. Er führt dies auf einen Druckfehler in der 5. Auflage seiner klinischen Diagnostik innerer Krankheiten S. 483 zurück, wo diese Angabe steht, während es heissen muss: „100 ccm“.

100 ccm einer 10%igen Phosphorsäurelösung sind aber doch 10 g! Warum schreibt er denn nicht einfach 10 g Phosphorsäure, dann wäre doch dieser Irrthum nicht geschehen? Er hat dann bei verschiedenen pathologischen Harnen²⁾ die Harnstoffbestimmung mit 10 g, 5 g, 3 g Phosphorsäure durchgeführt, hat in sehr vielen Fällen dieselben Zahlen erhalten, in einer Reihe von Fällen bei Anwendung geringerer Menge Phosphorsäure niedrige Zahlen für den Harnstoffwerth. Man müsste dann für jeden Harn die Menge Phosphorsäure ausprobiren, die nothwendig ist, den Harnstoff vollständig zu zersetzen. Unter solchen Umständen ist es doch praktischer, immer 10 g Phosphorsäure, die in allen Fällen genügend ist, zu nehmen, wenn man nicht „an chemischem Material sparen will“. Es ist aber ein alter Erfahrungssatz, dass an unrichtiger Stelle angebrachte Sparsamkeit sich bei chemischen Arbeiten meist bitter rächt.

4. Ueber die von A. Landau angegebene Modification der Phosphorsäuremethode.

In einer im v. Noorden'schen Laboratorium ausgeführten Untersuchung gibt A. Landau³⁾ eine Vereinfachung der Phosphorsäuremethode an, welche darauf beruht, dass man das Phosphorwolframsäure-Filtrat nicht erst mit Ca(OH)_2 alkalisch macht, sondern direct mit Phosphorsäure erhitzt. Er stellte folgenden Versuch an: In 10 ccm Harnstofflösung wurde mittelst Phosphorsäure der Stickstoff im Harnstoff bestimmt, dann wurde in 10 ccm derselben Harnstofflösung + 40 ccm Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung wiederum der Stickstoff bestimmt und dieselben Werthe für den Harnstoff-Stickstoff erhalten. Ich zweifle nicht an der Richtigkeit dieses Versuches. Aber man hat es beim Harne nicht mit reinen

1) A. a. O. S. 66.

2) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 50 S. 1—86. 1903.

3) A. Landau, Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. 79 S. 419. 1904.

Harnstofflösungen zu thun, sondern mit einem Gemenge von verschiedenen stickstoffhaltigen Stoffen, Farbstoffen, Salzen u. s. w., die sich nicht wie reine Harnstofflösungen verhalten.

Auch Pflüger und L. Bleibtreu¹⁾ haben schon an diese Vereinfachung gedacht, als sie die Methode ausarbeiteten. Sie äussern sich darüber folgendermaassen:

„Es lag nun noch die Möglichkeit einer Vereinfachung des Verfahrens vor, die Herstellung des Filtrats II²⁾ zu umgehen, indem man zu Filtrat I³⁾ die früher als nothwendig erkannte Menge Phosphorsäure zusetzt. Allerdings war gleich von vornherein ein Bedenken. Wenn das saure Filtrat I durch Verreibung mit Kalkpulver alkalisch gemacht worden ist, erscheint die Flüssigkeit tiefblau. Filtrirt man sofort, so scheiden sich noch beträchtliche Mengen von Sediment nachträglich ab. Wir liessen desshalb das mit Kalkpulver verriebene Filtrat I so lange bedeckt stehen, bis die Flüssigkeit farblos geworden ist, was allerdings eine Reihe von Stunden in Anspruch nimmt. Filtrirt man jetzt, so hat das Filtrat (II) die blaue Farbe verloren und ist überhaupt schwächer gefärbt als Filtrat I. Es muss der Kalk also noch Farbstoffe mit niedergerissen haben, wodurch es wahrscheinlich wird, dass das Filtrat II etwas ärmer an Stickstoff ist als Filtrat I. Es blieb aber immerhin möglich, dass diese durch Kalk gefällten stickstoffhaltigen, im Filtrat I noch vorhandenen Körper bei der Erhitzung mit Phosphorsäure kein Ammoniak liefern. Darüber konnte nur der Versuch entscheiden.“

Der Versuch ergab, dass die Erhitzung des Filtrats I mit Phosphorsäure den Harnstoffgehalt um 3,2 % höher nachwies als die Erhitzung des Filtrats II. Deshalb ist die von Landau angegebene Vereinfachung zu verwerfen, weil sie den Harnstoffgehalt zu hoch gibt. Ausserdem ist, wie ich später nachweisen werde, die Alkalisierung des sauren Filtrats unbedingt nothwendig für zuckerhaltige Harne.

5. Ueber den durch die Nichtfällbarkeit der Oxyproteinsäure durch Phosphorwolframsäure bedingten Fehler bei der Phosphorsäuremethode.

Durch eine systematische Untersuchung der im thierischen Organismus vorkommenden Amidkörper hatte ich eine Methode der

1) E. Pflüger und L. Bleibtreu, Pflüger's Arch. Bd. 44 S. 97.

2) Das Filtrat nach Neutralisiren mit Ca(OH)_2 .

3) Das Filtrat nach Fällung mit Phosphorwolframsäure-Salzsäure.

quantitativen Bestimmung des Harnstoffes in thierischen Organen und Flüssigkeiten ausgearbeitet, die auf der von Pflüger und L. Bleibtreu für den Harn angegebenen Phosphorsäuremethode beruhte, und die unter möglichster Vermeidung von Verlusten für eine wohl den Ansprüchen genügende Isolierung des Harnstoffes Sorge trug, die man bei der damaligen Kenntniss der im thierischen Organismus vorkommenden Amidsubstanzen an eine Harnstoffbestimmungsmethode stellen konnte.

Nun ist in neuerer Zeit von verschiedenen Forschern, Bondzynski und Gottlieb¹⁾, Pregl²⁾, Cloëtta³⁾, Töpfer⁴⁾, eine Säure beschrieben worden, die im normalen Harn vorkommt, stickstoffschwefelhaltig ist, Oxyproteinsäure genannt wird und sich dadurch auszeichnet, dass sie von Phosphorwolframsäure nicht gefällt wird. Bondzynski und Gottlieb geben an, dass im normalen Hundeharn bei reichlicher Fleischfütterung etwa 2,5 % des Gesamt-Stickstoffes, im Menschenharn bei gemischter Kost 2—3 % des Gesamt-Stickstoffes in Form von Oxyproteinsäure ausgeschieden werden. Im Hundeharn soll die Menge der Säure, auf das Barytsalz berechnet, etwa 10 g pro Liter betragen, beim Menschen in der 24 stündigen Harnmenge, auf Barytsalz berechnet, etwa 3—4 g. Von Töpfer werden diese Zahlen als viel zu hoch bezeichnet, während Pregl dieselben für richtig hält.

Um nun den Fehler festzustellen, welchen die Nichtfällbarkeit der Oxyproteinsäure durch Phosphorwolframsäure-Salzsäure bei der Phosphorsäuremethode haben kann, habe ich mir aus Hundeharn nach der Methode von Bondzynski und Gottlieb oxyproteinsauren Baryt dargestellt.

Die eben genannten Forscher geben als Stickstoffgehalt 10,64 % N an, sagen aber, dass die Analyse verschiedener Präparate von oxyproteinsaurem Baryt keine befriedigende Uebereinstimmung ergeben hätte.

Eine spätere Analyse von Bondzynski, Dombrowski und Panek⁵⁾ an einem reineren Präparat ergab 11,13 % N. Pregl

1) Bondzynski und Gottlieb, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1897 Nr. 33.

2) Pregl, Pflüger's Arch. Bd. 75 S. 87.

3) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol. Bd. 40 S. 29. 1899.

4) Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1897 Nr. 41.

5) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 46 S. 96. 1905.

gibt 7,0 und 8,49 % N an, Cloëtta findet bei sieben verschiedenen Präparaten 9,81, 9,96, 9,55, 9,68, 11,14, 9,09, 9,46 % N. Die Stickstoffbestimmung meines Präparates ergab 8,69 und 8,75 % N.

Für die Beurtheilung der Grösse des Fehlers, den die Gegenwart der Oxyproteinsäure bei der Harnstoffbestimmung verursachte, war es aber nothwendig festzustellen, wie viel Stickstoff sie bei der Erhitzung mit Phosphorsäure auf 150 ° C. abgab. Als Mittel aus vier Analysen ergab sich 3,88 % N als Ammoniak. Es wurden also bei der Erhitzung auf 150 ° C. mit Phosphorsäure nur 44 % des Stickstoffs als Amoniak abgegeben.

Daraus geht also hervor, dass bei der Phosphorsäuremethode der Harnstoffbestimmung durch die Gegenwart der Oxyproteinsäure der Harnstoff-Stickstoff um ungefähr 1 % zu hoch gefunden wird.

Pfaundler¹⁾ findet in einem ihm von Pregl überlassenen Präparat von oxyproteinsaurem Baryt 54,7—58,5 % dieses Stickstoffes durch Phosphorsäure abspaltbar, was mit meinen Analysen ziemlich übereinstimmt.

6. Bedingt die Gegenwart von Zucker einen Fehler bei der Harnstoffbestimmung durch die Phosphorsäuremethode?

Von verschiedenen Seiten ist neuerdings darauf aufmerksam gemacht worden, dass die Gegenwart von Zucker bei jeder Harnstoffanalyse, die auf der Abspaltung von Ammoniak beruhe, zu niedrige Werthe des Harnstoffes veranlasse, weil nach L. v. Udránsky²⁾ und Schoorl³⁾ die aus dem Zucker gebildeten Huminsubstanzen Ammoniak festbänden und durch Destilliren mit Alkali das Ammoniak nicht abgespaltet werden könne.

Mörner⁴⁾, bei dessen Harnstoffbestimmung bekanntlich der Harn zuerst mit Chlorbarium nebst Bariumhydroxyd und Alkoholäther ausgefällt wird und dann der rückständige Stickstoff nach Entfernung des Ammoniaks nach Kjeldal bestimmt wird oder nach einer Modification von Folin der Harnstoff mit Chlormagnesium und Salzsäure zerlegt wird, hatte gefunden, dass bei Gegenwart von nur 0,1 % Traubenzucker Verluste an Harnstoff-Stickstoff von 9—30 %

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 30 S. 80. 1900.

2) L. v. Udránsky, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 12 S. 42. 1888.

3) Schoorl, Chem. Centralbl. 1903 S. 1079.

4) K. Mörner, Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 14 S. 318 u. 334. 1903.

eintraten. Die Entfernung des Zuckers durch Vergährung zu bewirken, erwies sich nicht als zweckmässig, wenn auch in einem Falle der Verlust an Stickstoff geringer war, da der Harnstoff bei der Gährung gespalten und zersetzt werden konnte, besonders wenn die Gährung lange dauert und die Reaktion alkalisch wird. Es gelang ihm aber, den Zucker durch Zusatz von gepulvertem Bariumhydroxyd auszufällen und dann richtige Werthe für den Harnstoff zu erhalten.

Diese Angabe Mörner's über den schädlichen Einfluss der Gegenwart von Traubenzucker auf die Harnstoffanalyse steht in Widerspruch zu den Versuchen von Böttker¹⁾, der nach der Mörner-Sjöqvist'schen Methode den Harnstoff im Harne eines zuckerkranken Mädchens bestimmte. Derselbe fand als Mittel einer grossen Anzahl von Analysen des Harnstoffes bei einer täglichen Zuckerausscheidung von 10—53 g 87,4 % des Gesamt-Stickstoffes im Harnstoff-Stickstoff. Erst bei einer täglichen Zuckerausscheidung von 444 g fand er eine Abnahme auf 64,38 %. Böttker²⁾ hat eine geringe Modification des ursprünglichen Verfahrens angewandt. Statt des von Mörner und Sjöqvist vorgeschriebenen 96 % igen Alkohols in der Alkoholäthermischung gebrauchte er nur 90 % Alkohol, um dadurch die Löslichkeit des Bariumhydroxyds zu erhöhen und den nachträglichen Zusatz von MgO zur Entfernung des Ammoniaks überflüssig zu machen.

Durch die Anwendung des 90 % igen Alkohols ist wahrscheinlich genügend Bariumhydroxyd gelöst, um den Zucker zu entfernen, und dadurch erklärt es sich, dass Böttker auch in Zuckerharnen richtige Werthe für den Harnstoff erhielt. Erst bei der kolossalen Zuckerausscheidung von 444 g im Tage (= 8,8 %) war nicht genügend Bariumhydroxyd vorhanden, und jetzt findet er auch den kleinen Wert von 64,38 %.

Mörner hat auch die Phosphorsäuremethode in Bezug auf ihre Anwendung im Zuckerharn untersucht. Er stellte folgende Versuche an:

Abgewogene Mengen Harnstoff wurden mit 0,5 g Rohrzucker oder in einem anderen Versuche Traubenzucker in Phosphorsäurelösung (1,5 g der Säure) eingedampft, 4¹/₂ Stunden auf 150° erhitzt und das Ammoniak abdestillirt. Von dem Stickstoff des Harnstoffes

1) E. Böttker, Beitrag zur Kenntniss des Eiweissabbaues im menschlichen Organismus. Bergen 1896.

2) E. Böttker, Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 17 S. 143. 1892.

wurden bei Gegenwart von Rohrzucker nur 5,5—8,1 %, bei Gegenwart von Traubenzucker nur 29 % wiedergefunden.

In einem anderen Versuche wurde Harn mit dem gleichen Volumen einer 5 %igen Traubenzuckerlösung versetzt, mit Phosphorwolframsäure gefällt und mit 1,5—3 g Phosphorsäure erhitzt. Es ergab sich ein Verlust von 46—47 % des Harnstoff-Stickstoffes.

Demgegenüber ist zu bemerken, dass Mö r n e r diese bedeutenden Verluste an Harnstoff-Stickstoff zum grössten Theil auch gehabt hätte, wenn er gar keinen Zucker zugesetzt. Denn Mö r n e r hat die Phosphorsäuremethode nicht richtig angewandt. Wir schreiben ausdrücklich 10 g Phosphorsäure vor, und Mö r n e r nimmt 1,5, höchstens 3 g Phosphorsäure. v. Jacksch hat ja auch schon einmal, wie ich oben auseinandergesetzt, irrthümlicher Weise diesen Fehler begangen und musste zum Schlusse seiner Publication erklären, dass seine sämtlichen Harnstoffanalysen falsch seien und zu niedrige Werthe ergeben hätten.

Fast zu gleicher Zeit mit Mö r n e r hat auch v. Jacksch¹⁾ ähnliche Beobachtungen gemacht. Er fand bei Untersuchungen von diabetischen Harnen nur 41 %, 54 %, 50 % und 51 % des Gesamt-Stickstoffes im Harnstoff. Vermehrung der angewandten Phosphorsäure bis zu 30 g änderte an dem Ergebnisse nichts. Erst wenn der Harn vorher vergohren wurde, stieg im letzteren Falle der Harnstoff-Stickstoff auf 88 % des Gesamt-Stickstoffes.

Er glaubt den Grund für den Fehler darin zu finden, dass es im diabetischen Harn nicht gelingt, die Phosphorwolframsäure durch eine zur Neutralisation genügende Menge Kalk zu entfernen, dass der gelöste Zucker phosphorwolframsaures Calcium in Lösung hält und letzteres erst dann ausfällt, wenn der Zucker durch einen Ueberschuss von Kalk als Zuckerkalk unlöslich geworden ist. Ausserdem ginge der Zucker mit der Phosphorsäure Verbindungen ein, so dass ein Teil des Harnstoffes der Umsetzung in phosphorsaures Ammoniak entginge.

Landau²⁾, der, wie oben schon erwähnt, die Neutralisation mit Ca(OH)_2 unterliess, hat auch bei Diabetikerharnen so kleine Werthe für den Harnstoff-Stickstoff, dass sie ihm verdächtig schienen. Er hat desshalb Versuche mit bekannten Harnstofflösungen unter

1) v. Jacksch, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 50 S. 38. 1903.

2) A. a. O. S. 420.

Zusatz von Glykose angestellt, ohne Phosphorwolframsäure zuzusetzen und zu neutralisieren. Er findet schon bei einem Zuckerzusatz von 0.1 % Verluste von 0,5 %, die sich bei höherem Zuckergehalt steigern zu einem Verlust von 7 % bei 1 % Zucker und 23 % bei 3 % Zucker.

Schliesslich hat Rietschel¹⁾, der die Phosphorsäuremethode zur Bestimmung des Harnstoffes in der Milch benutzte, gefunden, dass reine Harnstofflösungen, auch mit Milchzucker versetzt, beim Erhitzen mit Phosphorsäure Verluste von ungefähr 40 % an Stickstoff aufwiesen.

Wenn auch alle diese Beobachtungen mit grosser Uebereinstimmung feststellten, dass die Phosphorsäuremethode für zuckerhaltige Harne und für Milch nicht brauchbar sei, so beschloss ich, mich doch erst selbst durch das Experiment von dieser Thatsache zu überzeugen und festzustellen zu suchen, ob es nicht vielleicht ausser der Vergärung des Zuckers, wie Mörner und v. Jacksch vorgeschlagen, doch ein Mittel gäbe, die Methode auch für den Zuckerharn brauchbar zu machen.

Serie I.

Versuch 1.

4 g Harnstoff, chemisch rein von Kahlbaum, und 2 g Traubenzucker (drei Mal nach Soxhlet aus Methylalkohol umkrystallisirt) werden in 200 ccm Wasser gelöst, also eine Lösung von 2 % Harnstoff und 1 % Traubenzucker.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldal ergab in 5 ccm dieser Lösung 46,7 mg N = 46,7 % N ber. 46,67 %.

Versuch 2.

5 ccm dieser Lösung ergaben beim 4^{1/2}stündigen Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150 ° C.:

Analyse I: 42,1 mg N,

„ II: 44,5 „ N,

„ III: 44,7 „ N,

also einen Verlust von 4,3—9,8 % an Stickstoff.

Es bestätigt sich also die Angabe, dass man beim Erhitzen einer Zucker-Harnstofflösung mit Phosphorsäure einen Verlust an Stickstoff von 4,3—9,3 % hat.

1) H. Rietschel, Jahrbuch der Kinderheilkunde Bd. 54 S. 132. 1906.

Versuch 3.

100 ccm der Zucker-Harnstofflösung + 200 ccm Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung. Keine Trübung. Nach 24 Stunden wird abfiltrirt und das Filtrat (I) mit Kalkhydratpulver alkalisch gemacht. Es wurde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Ueberschuss zugesetzt, da dadurch eine Möglichkeit gegeben war, den Zucker als unlösliches Kalksaccharat zu entfernen. Denn ebenso wie Mörner durch festes Bariumhydroxyd den Zucker als Zuckerbaryt entfernt, konnte es doch möglich sein, durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Ueberschuss den Zucker zu fällen.

Nach Beilstein¹⁾ bildet der Traubenzucker mit Kalk zwei Salze: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{CaO}$ und $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}$. Dieses letztere, welches hier in Betracht kommt, wird nach Peligot²⁾ erhalten, wenn man Zuckerlösungen mit gelöschtem Kalk versetzt. Dasselbe ist in Wasser schwer löslich, 100 Theile Wasser lösen 0,73 Theile des Kalksalzes. Es war also wahrscheinlich, dass der im Filtrat I vorhandene Zucker als Kalksaccharat gefällt wurde, wenn man beim Neutralisiren der Phosphorwolframsäure Kalkhydratpulver im Ueberschuss zusetzte.

Wenn man das Filtrat I mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ alkalisch macht, so nimmt es bekanntlich eine tiefblaue Farbe an, und es ist Vorschrift, dass man mit der weiteren Analyse warten muss, bis diese blaue Farbe verschwunden ist, was oft mehrere Stunden in Anspruch nimmt. Nun behauptet v. Jacksch, dass bei Anwesenheit von Zucker im Harn es nicht möglich sei, die blaue Farbe zum Verschwinden zu bringen, wenn man das Filtrat I mässig alkalisch macht, weil der Zucker das phosphorwolframsaure Calcium in Lösung halte. Ich kann demgegenüber nur sagen, dass es auch im diabetischen Harn gelingt, die blaue Farbe zum Verschwinden zu bringen, wenn man genügend lange wartet und etwas $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Ueberschuss zusetzt. Es ist sehr zweckmässig und beschleunigt das Verschwinden der blauen Farbe, wenn man die ganze mit Kalk verriebene Mischung in einen Kolben bringt und ab und zu kräftig schüttelt.

Wie oben erwähnt, wurde das Filtrat I mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ im Ueberschuss verrieben. Nach Verschwinden der blauen Farbe wird ab-

1) F. Beilstein, Handbuch der organischen Chemie Bd. 1 S. 1046. Hamburg 1893.

2) Peligot, Compt. rend. t. 90 p. 153. 1880, und Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie 1880 S. 1018.

filtrirt und im Filtrat II der Harnstoff-Stickstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäure bestimmt.

In 15 ccm Filtrat II = 5 ccm Zuckerharnstofflösung gefunden:
46,9 mg N und 47,0 mg N,
also dieselben Zahlen wie bei der Kjeldal'schen Analyse.

Es geht also aus diesem Versuche hervor, dass auch in Zucker-Harnstofflösung die Phosphorsäuremethode richtige Werthe für den Harnstoff gibt.

Serie II.

Der Versuch wurde in derselben Weise wiederholt.

2,751 g Harnstoff werden in 300 ccm Wasser gelöst. 2 g Traubenzucker in 200 ccm Harnstofflösung gelöst.

Versuch 1.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldal in der Harnstofflösung ergab in 5 ccm 21,5 mg N, berechnet 21,39 mg N.

Die Stickstoffbestimmung der Harnstoff-Zuckerlösung ergab ebenfalls 21,5 mg N.

Die Harnstoffbestimmung durch Erhitzen mit Phosphorsäure ergab in der Harnstofflösung 21,4 mg N in \bar{U} .

Versuch 2.

5 ccm Zucker-Harnstofflösung ergeben beim Erhitzen mit Phosphorsäure:

Analyse I = 20,7 mg N,

„ II = 20,2 „ N,

im Mittel 20,45 mg N, also ein Verlust von 4,4 %.

Versuch 3.

100 ccm Zucker-Harnstofflösung + 200 ccm Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung.

Nach 24 Stunden abfiltrirt mit Ca(OH)_2 -Pulver im Ueberschuss verrieben und nach Verschwinden der blauen Farbe abfiltrirt.

In 15 ccm Filtrat II = 5 ccm Zucker-Harnstofflösung gefunden:

Analyse I = 21,55 mg N,

„ II = 21,45 „ N in \bar{U} ,

also dieselben Zahlen, wie bei der Kjeldal'schen Analyse und eine Bestätigung des Ergebnisses von Serie I.

Serie III.

Um festzustellen, ob man auch im diabetischen Harn richtige Werthe für den Harnstoff mit der Phosphorsäuremethode erhielt, wurde im Harne eines Diabetikers mit 0,4 % Zucker der Harnstoff-Stickstoff im Verhältniss zum Gesamt-Stickstoff bestimmt.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldal ergab 0,573 % N,

die Stickstoffbestimmung im Filtrat II . . . 0,558 % N,

die Harnstoffbestimmung 0,5233 % N,

also sind im Harnstoff 91,3 % des Gesamt-Stickstoffes enthalten, ein Werth, der mit den für den normalen Menschenharn gefundenen Werthen übereinstimmt.

Es geht also aus diesen Versuchen hervor, dass auch für Zuckerharne die Phosphorsäuremethode richtige Werthe für den Harnstoff gibt, wenn man den Harn auf ca. 1 % Zucker bringt und beim Neutralisiren des Phosphorwolframsäure-Filtrats mit Kalkhydratpulver für einen Ueberschuss an Kalk Sorge trägt.

Ich möchte noch auf eine Beobachtung aufmerksam machen, die ich beim Abdestilliren des phosphorsauren Ammoniaks gemacht habe. Um sicher zu sein, dass alles in Ammoniak übergegangen ist, muss man die Destillation so lange fortsetzen, bis fast alle Flüssigkeit im Destillationskolben überdestillirt ist.
