

Filtrieren. Aus dem Filtrate scheidet man durch Einleiten von Kohlensäure noch vorhandenen Baryt ab und engt das Filtrat im Vakuum bis zum dicken Sirup ein, den man mit Ätheralkohol (2 Vol. Alkohol: 1 Vol. Äther) behandelt und 24 Stunden (zur Entfernung des Harnstoffes) stehen läßt; die Lösung wird durch ein Filterchen filtriert und die im Kolben, auch auf dem Filter verbliebene schmierige Masse in wenig warmem Wasser gelöst. Man dampft die Lösung mit Sand im Hofmeisterschen Schälchen ein, zieht den zerriebenen Schaleninhalt 3—5 Stunden in einem Soxhletschen Apparat mit absolutem Alkohol aus, löst den mit Alkohol behandelten Rückstand im Apparat mit warmem Wasser und bringt das wässrige Filtrat auf ein bestimmtes Volumen; in dieser wässrigen Lösung sind die Bariumsälze der 3 Proteinsäuren; Harnstoff, Hippursäure, Kreatinin sind entfernt; man bestimmt in der wässrigen Lösung nach Kjeldahl den Stickstoff der Proteinsäuren.

Gawirski fand beim normalen Menschen bei einer Ausscheidung von 10,5—18,5 g Stickstoff für den Liter 0,56—1,26 g Stickstoff als Proteinsäuren-Stickstoff = 4,5—6,8% des Gesamtstickstoffs.

Die Übersicht S. 245, von M. Weiss entworfen, veranschaulicht die Trennung der drei Säuren und weist auf den die Ehrlichsche Diazoreaktion verursachenden Körper hin.

O. v. Fürth¹⁾, A. Mandina Veitia²⁾ bringen Mitteilungen über Verfahren zur Bestimmung und über die Oxyproteinsäure im Urin und im Blut.

Eigenschaften.

Die Oxyproteinsäure mit 18,082% Stickstoff und 1,12% Schwefel ist in Wasser löslich, auch ihre Salze lösen sich in Wasser; aus wässriger Lösung wird sie bei neutraler Reaktion durch essigsaures und salpetersaures Quecksilber, nicht durch Bleiessig gefällt. Der Schwefel wird beim Kochen mit Kalilauge zum Teil als Schwefelwasserstoff abgespalten. Sie ist jedenfalls eine höhere Oxydationsstufe der Antoxyproteinsäure. Die Lösungen der Salze sind optisch inaktiv; sie gibt nicht die Ehrlichsche Diazoreaktion, auch nicht die Biuretprobe.

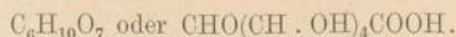
Die Alloxyproteinsäure mit 13,55% Stickstoff und 2,19% Schwefel wird durch Bleiessig gefällt. Sie gibt die gewöhnlichen Eiweißreaktionen (Biuret usw.) nicht, auch nicht die Ehrlichsche Diazoreaktion, enthält durch Alkali als Schwefelwasserstoff abspaltbaren Schwefel.

Die Antoxyproteinsäure mit 24,40% Stickstoff und 0,61% Schwefel ist löslich in Wasser, die Lösung ist rechtsdrehend. Die Säure gibt keine Eiweißreaktionen, aber bei der Vornahme der Diazoreaktion nach Ehrlich mit Diazobenzolsulfosäure eine karminrote Färbung, ebenso mit Paradiazetophenon nach Friedenwald.

Die von Cloetta isolierte, Uroprotsäure genannte Säure wird nach den Untersuchungen von Bondzyński, Dombrowski und Panek aus mehreren Säuren bestehen.

Zu erwähnen sind hier noch ein von P. Hári³⁾ aus Menschenharn dargestellter Körper, eine stickstoffhaltige Säure, der polypeptidartige Körper von E. Abderhalden und F. Pregl⁴⁾, aus Menschenharn gewonnen, der wohl einen Abkömmling der Eiweißstoffe darstellt und dem totalen Abbau im Stoffwechsel entgangen ist und eine Chromoxyproteinsäure von O. Bocchi und A. Ghelfi, dann von Oliari isoliert, die als Trägerin der Diazoreaktion angesehen wird, die aber nach Weiss das Urochromogen enthält (s. dieses).

22. Glykuronsäure. Glucuronsäure.



Die Glykuronsäure, eine Tetraoxyaldehydsäure, kommt als solche, als freie, im Harn nicht oder nur vielleicht in Spuren vor; infolge der Einverleibung

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1915. 69. 448.

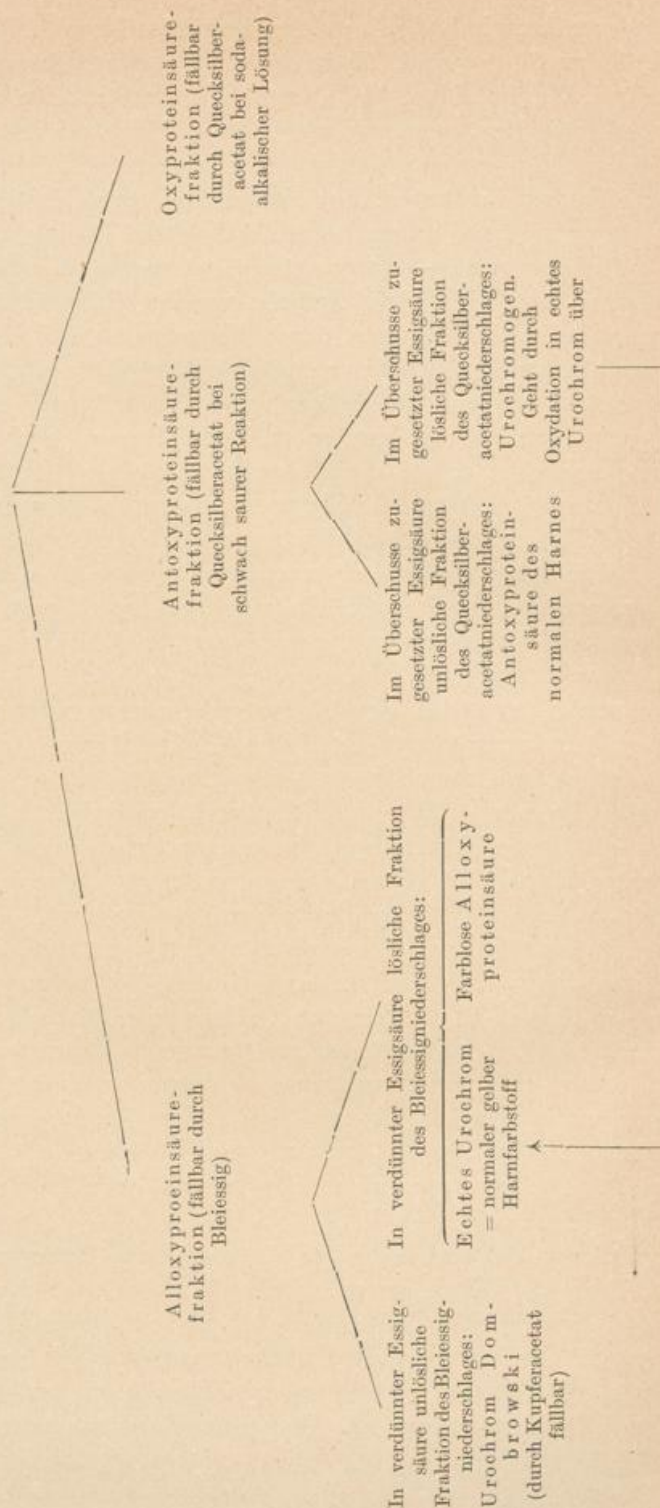
²⁾ Ann. soc. espaniol. Fils. Quim. 1919. II. 17. 136.

³⁾ Orvosi Archiv. 1904. 6. 585; Zeitschr. physiol. Chem. 1905. 46. 1.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1905. 46. 19.

Proteinsäurenfraktion

(Fraktion der Substanzen, die wasserlösliche, durch Alkohol fällbare Barytsalze bilden)



verschiedener Arzneimittel, als welche besonders Chloral, Chloroform, Phenol, Kresol, Thymol, Guajacol, Hydrochinon, Resorcin, Brenzkatechin, Orcin, Terpentinöl, Menthol, Naphthol, Camphor, Acetanilid, überhaupt die Aniline, Kairin, Morphin usw. zu nennen sind, ferner infolge der Entstehung gewisser aromatischer Körper durch Fäulnis im Darmkanal (Phenole, Indol) können im Harn Produkte auftreten, die als esterartige (glykosidartige) Verbindungen verschiedener fester und aromatischer Alkohole und Phenole mit der Glykuronsäure aufzufassen sind — gepaarte Glykuronsäuren. Der Glykuronsäure kommt hier die gleiche Aufgabe wie der Schwefelsäure zu, für den Organismus giftige Substanzen durch Kuppelung unschädlich zu machen, sie dienen also zur Entgiftung; vorzüglich wird Glykuronsäure zur Entgiftung von Phenolen, zu denen sie größere Verwandtschaft, wie die Schwefelsäure hat, herangezogen. Diese erwähnten Verbindungen werden durch hydrolysierende Agenzien, so bei der Behandlung mit verdünnten Säuren unter Aufnahme von 1 Mol. Wasser in Glykuronsäure und in die zugehörigen Alkohole gespalten. Die Menge der aus den gepaarten Glykuronsäuren im normalen Harn täglich abgespaltenen Glykuronsäure beträgt nach den Arbeiten von P. Mayer und C. Neuberg¹⁾, die zuerst kleine Mengen von gepaarten Glykuronsäuren im Harn vorfanden, ungefähr 0,04 g, nach C. Tollens²⁾ 0,35 g, doppelt soviel wie Ätherschwefelsäure.

So werden von den am häufigsten vorkommenden und bekannten gepaarten Glykuronsäuren die Camphoglykuronsäure (nach Genuß von Camphor) in Champhaol und Glykuronsäure, die Urochloralsäure (nach Einnehmen von Chloral) in Trichloräthylalkohol und Glykuronsäure zersetzt; die Phenoglykuronsäure erscheint nach Phenoleinnahme neben Phenylschwefelsäure im Harn, ebenso wie nach Thymoleingabe Thymolchwefelsäure neben Thymoglykuronsäure entsteht. Terpentinöl gibt Terpenglykuronsäure. Die gepaarten Glykuronsäuren, die im normalen Harn zunächst vorhanden sein können, sind die Indoxyl-, Skatoxyl-, Phenol-, p-Kresol-glykuronsäure. Eine vermehrte Bildung der Glykuronsäure findet sich bei den Vorgängen im Organismus, die auch eine Vermehrung dieser Phenole (z. B. bei Darmfäulnis) bedingen; vermehrt kann die Ausscheidung weiter sein bei schweren Respirationsstörungen, starker Dyspnoe, bei Diabetes mellitus.

Zur Darstellung gepaarter Glykuronsäuren kann man in folgender Weise verfahren:

Man dampft die innerhalb eines Tages entleerte Harnmenge oder größere Mengen Harn zum Sirup ein und schüttelt diesen nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure mit Alkoholäther (1:2) einige Male tüchtig aus. Der Verdunstungsrückstand der Alkoholätherlösung wird mit Wasser aufgenommen, die Lösung mit neutralem Bleiacetat behandelt und filtriert. Aus dem Filtrate fällt man die Glykuronsäureverbindungen mit Bleiessig;

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1900. 29. 256.

²⁾ Ebenda. 1910. 68. 138.

ein Überschuß muß vermieden werden, da er die basischen Salze der Glykuronsäure wieder teilweise lösen kann; der Bleiniederschlag wird nach dem Abfiltrieren in Wasser verteilt, durch Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Schwefelbleiniederschlage nach dem Entfernen des Schwefelwasserstoffes (am besten durch Durchleiten von Luft) mit Barytwasser neutralisiert. Man dampft auf ein kleines Volumen ein, zerlegt das Barytsalz durch die nötige Menge verdünnter Schwefelsäure und engt das Filtrat vom Bariumsulfat auf dem Wasserbade, zuletzt im Vakuum, ein. Die gepaarten Glykuronsäuren, die meist schön krystallisieren, scheiden sich hierbei aus.

Man kocht die Krystallmasse mehrmals mit Äther aus und verdunstet die ätherischen Lösungen. Auf diese Weise stellt man die Urochloralsäure dar, deren Krystalle bei 142° schmelzen.

C. Neuberg und S. Lachmann¹⁾ verfahren ähnlich bei der Darstellung von Mentholglucuronsäure. Der Harn wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit etwa einem Viertel seines Volumens Äther und einem Achtel Alkohol von 98% versetzt und 4 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Der abgetrennte und filtrierte Ätherauszug wird mit konzentriertem Ammoniak bis zur ausgesprochen alkalischen Reaktion versetzt und abdestilliert. Von selbst oder auf Zusatz von etwas konzentriertem Ammoniak krystallisiert fast der gesamte Ätherrückstand. Man saugt am nächsten Tage das schwer lösliche mentholglucuronsaure Ammoniak ab und wäscht es mit Wasser. Es verliert an der Luft leicht Ammoniak. Das Salz löst man in möglichst wenig heißem Wasser, fällt mit Bleiessig, zerlegt den ausgewaschenen Niederschlag in gelinder Wärme vollständig mit Schwefelwasserstoff und dampft das Filtrat vom Bleisulfid ein. Man erhält Mentholglucuronsäure, die auch durch Umkrystallisieren des rohen Ammoniumsalzes aus salzsäurehaltigem Wasser entsteht. Die Spaltung erfolgt beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure. Das entstehende Menthol wird ausgeäthert. Bleizucker, Bleiessig sollen im Überschuße nicht zur Anwendung kommen.

Nach J. Bang²⁾ läßt sich die Methode noch einfacher gestalten.

Man versetzt den gesammelten Harn mit Ammoniumsulfat bis zur Halbsättigung, erhitzt zum Kochen und filtriert warm. Beim Abkühlen scheidet sich das Ammoniumsalz der Mentholglucuronsäure schneeweiß aus, und zwar so gut wie quantitativ. Die freie Säure läßt sich dann entweder durch Umkrystallisieren aus säurehaltigem Wasser oder Auflösen in säurehaltigem Alkohol bequem darstellen.

Die Glykuronsäure ist in erster Linie als ein Entgiftungsprodukt anzusehen (F. Blumenthal) und stellt ein Derivat der Glucose dar; dies wurde durch die Überführung der Glykuronsäure in d-Zuckersäure durch Thierfelder und durch die Synthese von der d-Zuckersäure aus von E. Fischer und Piloty³⁾ bewiesen. A. Jolles⁴⁾ stellte durch Oxydation von Glucose Glykuronsäure dar. Vielleicht ist die Glykuronsäure als ein Produkt unvollständiger Zuckeroxydation aufzufassen, bei der die Glykuronsäure infolge der Unfähigkeit des Organismus nicht weiter zu Kohlensäure und Wasser verbrannt wird; dies würde mit der Tatsache in Übereinstimmung stehen, daß die Ausscheidung von gepaarten Glykuronsäuren häufig bei der alimentären Glykosurie, sowie beim Diabetes mellitus beobachtet wird; es wurden sogar bei größerer Zufuhr von Kohlenhydraten solche Glykuronsäuren im Harne vorgefunden, bevor nur eine Zuckerausscheidung sich bemerkbar machte. Ausgeschlossen ist auch nicht, daß die Säure nicht nur aus den Kohlen-

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1910. 24. 416.

²⁾ Ebenda. 1911. 32. 445.

³⁾ Berl. Bericht. 1891. 24. 521.

⁴⁾ Sitzungsber. Akad. Wissensch. Wien 1911. Separatabdr.; Berl. klin. Wochenschr. 1912. 49. Nr. 39.

hydraten, auch aus Glykogen, sondern auch aus Eiweißstoffen entstehen kann; letztere Ansicht ist in letzter Zeit bezweifelt worden. Endlich ist noch zu erwähnen, daß nach Schmiedebergs Versuchen und Untersuchungen die Glykuronsäure auch aus der Chondroitinschwefelsäure des Knorpels entstehen kann, da bei der künstlichen Zersetzung der genannten Verbindung, die ja auch im Harn vorhanden ist, wirklich Glykuronsäure entsteht.

Bial und Huber fanden, daß die Säure im Darm gebildet wird, P. Mayer und Lépine konnten sie im Blut und in der Leber vorfinden.

Eigenschaften und Erkennung (Nachweis) glykuronsäurehaltiger Harnes.

Solche Harnes drehen, obwohl die reine Säure rechts dreht, fast immer links, da die gepaarte Säure vorliegt; eine Linksdrehung über 0,05% läßt schon auf Glykuronsäure schließen, zumal wenn nach dem 1—2stündigen Kochen des Harnes mit 1—5%iger Schwefelsäure oder Salzsäure im Wasserbade am Rückflußkühler diese Linksdrehung in Rechtsdrehung verwandelt wird, wenn Reduktion eintritt und wenn auch noch der Nachweis von Phenol, Indoxyl neben Ätherschwefelsäure zu erbringen ist. Nach Lysolvergiftung z. B. kann die Drehung mehrere Grade oder (auf Zucker berechnet) mehrere Prozente betragen. Bei der Vornahme der polarimetrischen Prüfung ist zu berücksichtigen, daß der Harn sauer sein muß, da in alkalischer Lösung nach Haas die Drehung verschwindet; endlich kann es auch noch vorkommen, daß durch eine stattgefundene Zersetzung, durch Bildung der freien Säure, glykuronsäurehaltiger Harn möglicherweise doch hie und da Rechtsdrehung zeigen kann. Am zweckmäßigsten wird man das Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag nach der Behandlung mit Bleiessig (s. Darstellung) für diese Versuche verwenden. Glykuronsäurehaltige Harnes reduzieren im allgemeinen Fehlingsche Lösung (Ausnahmen machen die Phenol- und Camphoglykuronsäure) und zwar einige direkt, andere erst nach längerem Kochen (Indoxylglykuronsäure); freie Säure reduziert, da sie eine Aldehydgruppe enthält, schon in der Kälte. Nach vorausgegangener Spaltung durch Erhitzen mit Säuren reduzieren alle Glykuronsäuren und geben dann auch mit Phenylhydrazin Abscheidungen, die mit dem Glykosazon verwechselt werden können. Glykuronsäurehaltiger Harn gärt nicht, weder vor noch nach der Hydrolyse. Diese Eigenschaften der Glykuronsäuren sind von großer Wichtigkeit bei dem Zuckernachweise.

Nachweis.

1. Man nimmt die Orcinprobe (s. Pentosen) vor und zwar, nachdem man den Harn mit Schwefelsäure erwärmt und die Verbindung gespalten hat, da in ungespaltenem Harnes diese Probe negativ ausfällt. Man kann auch etwa 3 ccm Harn nach Zugabe von etwas Orcin mit 5 ccm konzentrierter Salzsäure zum Sieden erhitzen und etwa $\frac{1}{2}$ Minute kochen, bis die Lösung trübe violett geworden ist. Den gebildeten Farbstoff schüttelt man mit Amylalkohol aus;

es zeigt sich zwischen C und D der charakteristische Streifen. Weiter nimmt man die Polarisierung in der oben angegebenen Weise vor.

Beurteilung.

Für den klinischen Bedarf wird diese Probe in den meisten Fällen ausreichen, wenn sie auch unter Umständen versagen kann; es liegt erstens die Möglichkeit vor, daß der bei der Spaltung der stets linksdrehenden gepaarten Glykuronsäure mit verdünnter Schwefelsäure abgetrennte Paarling auch optische Aktivität besitzt (z. B. Camphor, Menthol usw.) und daß der Harn ferner infolge der Säurebehandlung dunklere Färbung annehmen kann, die man durch Behandlung mit Tierkohle wegen Aufnahme der Glykuronsäure durch die Kohle nicht auf diese Weise entfernen kann. Auch die Orcinsalzsäurereaktion kann unter Umständen im Stiche lassen. Ich benutze mit gutem Erfolge für diese Proben, wie schon oben erwähnt, das Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag (s. Darstellung).

2. Zum genauen Nachweis müßte man nach P. Mayer und C. Neuberg¹⁾ verfahren und die p-Bromphenylhydrazinverbindung darstellen. Man spaltet im Filtrate vom Schwefelbleiniederschlag nach der Behandlung mit Bleiessig (s. Darstellung) die vorhandene gepaarte Glykuronsäure durch etwa 2stündiges Kochen mit Schwefelsäure (die Flüssigkeit muß 1–2% Schwefelsäure enthalten), neutralisiert genau mit Natriumcarbonat und versetzt die filtrierte Flüssigkeit mit einer vorher erhitzten Lösung von 5 g reinem salzsaurem p-Bromphenylhydrazin und 6 g Natriumacetat; man erwärmt das Becherglas, das mit einer Glasschale bedeckt ist, im Wasserbade etwa 10 Minuten lang und filtriert. Beim Erkalten erfolgt reichliche Bildung von Krystallen, die abgesaugt werden; die Mutterlauge wird von neuem erhitzt, die sich abscheidenden Krystalle werden gesammelt. Die Hydrazinverbindung wäscht man mit heißem Wasser und mit absolutem Alkohol und krystallisiert sie mehrmals aus 60%igem Alkohol um; durch Lösen in Pyridin und Ausfällen mit Ligroin können die Krystalle vollständig gereinigt werden. Diese Hydrazinverbindung prüft man polarimetrisch, indem man 0,2 g in einer Mischung von 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol löst und in der 100 mm-Röhre polarisiert. Die Hydrazinverbindung dreht sehr stark links ($-7^{\circ}25'$).

Die reinen Krystalle schmelzen bei 236° .

3. B. Tollens²⁾ beschreibt folgendes, auch zur Unterscheidung von den Pentosen dienendes Verfahren:

Zu 5 ccm Harn fügt man in einem 15–20 mm weiten Reagenzrohr eine etwa hirsekorngroße Menge Naphthoresorcin oder 0,5–1,0 ccm einer 1%igen alkoholischen Lösung desselben und 5 ccm rauchende Salzsäure (1,19). Man erwärmt langsam über der Flamme zum Kochen und setzt das Kochen unter Bewegen des Rohres über ganz kleiner Flamme noch eine Minute gelinde fort. (Nach einer weiteren Mitteilung³⁾ stellt man das Reagenzglas mit Inhalt

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1901. **29**, 256; Berl. Bericht. 1899. **32**, 2395.

²⁾ Münch. med. Wochenschr. 1909. **56**, 652; Pharm. Centrhl. 1910. **51**, 341.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1910. **64**, 39.

15 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad.) Nach 4 Minuten langem Stehen kühlt man das Reagenzglas unter der Wasserleitung ab und schüttelt mit der gleichen Raummengung Äther kräftig aus. Die klar abgesetzte Ätherschicht (wenn nötig, Zusatz einiger Tropfen Alkohols) ist, wenn Glykuronsäure vorhanden ist, je nach der Menge dunkelblau bis violett, bei geringem Gehalte in ein schwach rötliches Violett übergehend. Vor dem Spektralapparate zeigt sie ein deutliches dunkles Band in der Gegend der Natriumlinie, rechts von der D-Linie. Man kann auch, wie erwähnt, 0,5 ccm einer 1%igen alkoholischen Naphthoresorcinlösung anwenden, doch ist die Ausführungsform mit festem Naphthoresorcin nach C. Neuberg sicherer.

Beurteilung.

Nach B. Tollens kann man mit der Reaktion die in einer Reihe normaler Harnen vorhandene Glykuronsäure erkennen. Bei Verwendung der schon erwähnten Arzneimittel erhält man eine deutliche und starke Reaktion. Die Ätherschicht ist dunkelviolet bis tiefblau und man muß 2–3fach mit Äther verdünnen, um im Spektralapparat das breite schwarze Absorptionsband zu erkennen. Bei mit Lysol vergifteten wurde eine sehr starke Reaktion erhalten. Man kann aus der Stärke der Reaktion einen Schluß ziehen, ob eine mehr oder weniger starke Vermehrung der Glykuronsäure vorliegt. Nach J. A. Mandel und C. Neuberg sollen verschiedene im Harn vorkommende Stoffe (Allantoin, Brenztraubensäure, Carbonylsäuren überhaupt usw.) ähnliche oder gleiche Reaktion geben. Tollens fand, daß zwar ätherlösliche Farbstoffe entstehen, die aber die Ätherschicht nicht charakteristisch blauviolett, sondern mehr oder weniger intensiv kirschfeuerrot oder verwaschen rötlich färben. Die Gegenwart von Traubenzucker setzt die Empfindlichkeit herab. Man soll dann nach P. Mayer und Neuberg vorgehen, den Harn zuerst mit Bleizucker, das Filtrat davon mit Bleiessig fällen. Die beiden Niederschläge wäscht man aus, trocknet sie leicht auf porösen Tontellern und stellt damit, auch mit dem letzten Filtrate die Reaktion mit Naphthoresorcin usw. an. Wenn nur wenig Glykuronsäure im Harn vorhanden war, erhält man jedenfalls mit dem zweiten Niederschlage (Bleiessigfällung), der die meiste Glykuronsäure enthält, den deutlich blauen Ätherauszug mit gut sichtbarem Absorptionsstreifen. Mit diesem Niederschlage bekommt man die Reaktion sehr schön rein. Wenn viel Glykuronsäure vorhanden ist, geben auch der erste Niederschlag und das zweite Filtrat noch positive Reaktionen. Neuberg empfiehlt, die Ätherschicht zu filtrieren, um sich vor Täuschungen zu schützen; die durch Zucker veranlaßten, im Äther suspendierten Farbstoffe geben dem Äther eine Färbung, der filtrierte Äther ist aber dann farblos.

A. Jolles¹⁾ empfiehlt zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Tollensschen Reaktion 200–400 ccm Harn zuerst mit Bleiacetat und das Filtrat hievon mit Bleiessig zu fällen, die beiden ausgewaschenen vereinigten Niederschläge mit Wasser verrührt in einem Kolben nach dem Erwärmen auf 70° mit Schwefelwasserstoff zu behandeln und das Filtrat auf 20 ccm einzuzengen. Nach dem Erkalten nimmt man mit 5 ccm der Lösung die Probe wie angegeben vor.

C. Neuberg und O. Schewket²⁾ lassen 5–10 ccm frischen Harn in einem kleinen Scheidetrichter mit etwa 2 ccm verdünnter Schwefelsäure versetzen und mit 10 ccm Alkohol und 20 ccm Äther mehrmals ausschütteln. Der abgelassene Äther wird mit 2–3 ccm Wasser oder Chlornatriumlösung gewaschen und abfiltriert; mit dem Rückstande können die Proben 1 und 3 angestellt werden.

4. Eine Spur Glucuronsäure, mit 1–2 Tropfen einer 15%igen alkoholischen α -Naphtholösung versetzt, gibt auf Zusatz von 3–4 ccm konz. Schwefelsäure eine tief smaragdgrüne Lösung. (G. Goldschmidt³⁾).

Zum Nachweis im Harn versetzt man $\frac{1}{2}$ –1 ccm Harn mit 2 Tropfen der α -Naphtholösung und schichtet diese Mischung sehr vorsichtig auf 3–4 ccm konz. Schwefelsäure; an der Berührungsstelle der Schichten erscheint ein violetter Ring, der beim ruhigen Stehen nach der Harnseite an Breite zunimmt, während infolge Diffusion des Harnes in die Schwefelsäure diese von der Grenzfläche aus nach unten sich grün färbt; man sieht auch manchmal dunkelgrüne Schlieren sich nach unten verbreiten. $\frac{1}{2}$ ccm Harn gibt die Reaktion sehr deutlich und zwar nicht nur den grünen Ring und die

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1912. 81. 203; Pharm. Centrallh. 1912. 53. 1090; Zeitschr. angew. Chem. 1912. 25. 2015.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 1912. 44. 502; 1913. 55. 4.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1910. 65. 392.

Schlieren, sondern es färbt sich sogar, wenn man die Probe, ohne sie gemischt zu haben, etwa $\frac{1}{4}$ Stunde ganz ruhig stehen läßt und dann durchmischt, die ganze Flüssigkeit smaragdgrün. Man soll noch 0,008 mg im Harne nachweisen können.

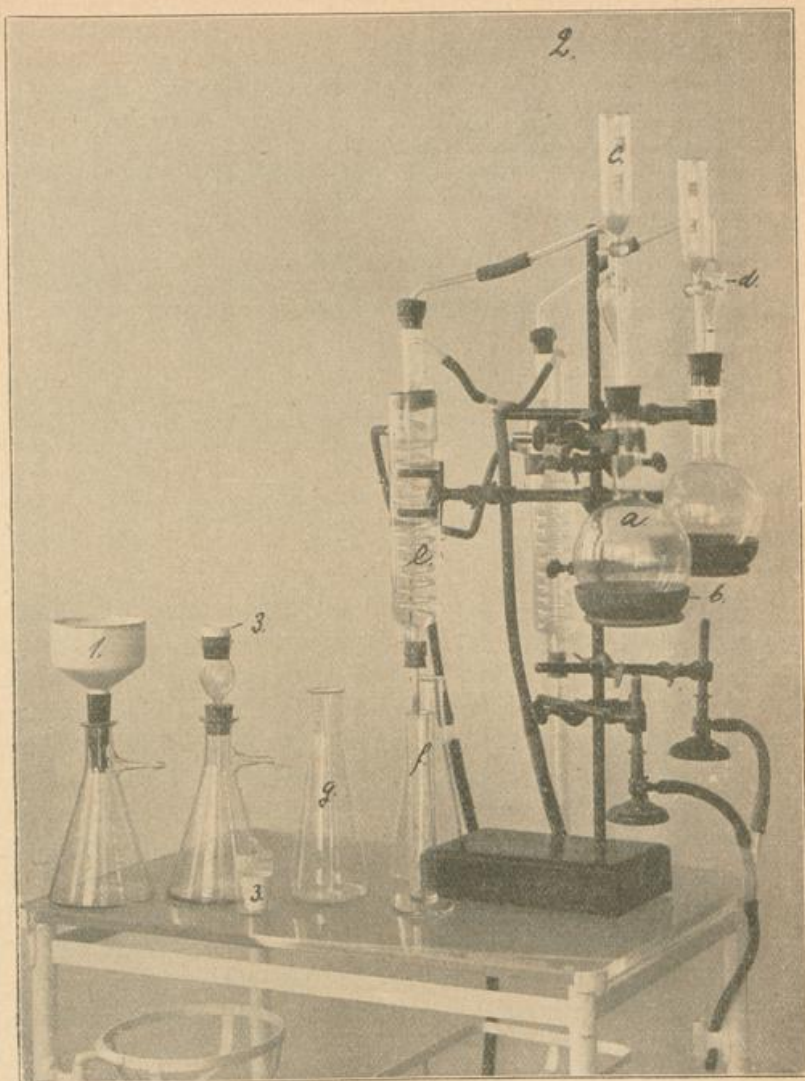


Fig. 40.

Beurteilung.

Nitrate, Nitrite geben die gleiche Reaktion; solche können leicht im Harne, auch in der Schwefelsäure enthalten sein. Es ist daher Vorsicht geboten. Prüfung erst mit Diphenylamin vornehmen! (E. Luther, C. Neuberg, L. v. Udránszky.)

Quantitative Bestimmung nach C. Tollens.¹⁾

Prinzip des Verfahrens ist, die Glucuronsäure durch Destillation mit Salzsäure in Furfurol und Kohlensäure zu spalten, $C_6H_8O_6 = C_2H_4O_2 + CO_2 + H_2O$, Glucuronsäurelacton = Furfurol + $CO_2 + H_2O$; diese Spaltung

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 61. 95.

haben de Chalmot, Mann und B. Tollens zuerst ausgeführt. Das abdestillierte Furfurol wird dann mit Phloroglucin aus der Salzsäure enthaltenden Lösung ausgefällt. Der Niederschlag, das Furfurolphloroglucid, wird nach dem Abfiltrieren und Trocknen gewogen. Das Gewicht des Furfurolphloroglucids ist, wie Lefèvre und Tollens¹⁾ wieder fanden, genau $\frac{1}{2}$ der vorhanden gewesenen Glykuronsäure.

Erforderliche Apparate und Reagenzien.

1. Eine ziemlich große Nutsche mit Saugflasche und gehärtetem Filtrierpapier.
2. Ein Destillierapparat, ähnlich dem von B. Tollens angegebenen. Fig. 40.
 - a) 1 Literkolben aus Jenaer Glas.
 - b) Metallbad mit Roseschem Metall.
 - c) Hahntrichter, der zweckmäßig 75 ccm faßt und mit Marken bei 30 und 60 ccm versehen ist.
 - d) Schaumfänger.
 - e) Schlangenkühler.
 - f) Graduirter, 100 ccm fassender Zylinder.
 - g) Gefäß zum Auffangen des Destillates mit Marke bei 400 und 500 ccm.
3. Porzellangoochtiiegel mit Wägegläschen und passender Saugflasche.
4. Bleiessig.
5. Ammoniak.
6. Salzsäure vom spez. Gew. 1,060.
7. Phloroglucinum purissim. (Merck).
8. Als Reagens auf Furfurol eine frische Lösung von gleichen Teilen Wasser und Anilin, der so lange konzentrierte Essigsäure zugetropft ist, bis die (plötzlich eintretende) Klärung erfolgt ist.
9. Lang- und feinfaseriger Asbest.

Die Herrichtung des Filters im Gochtiiegel ist S. 38 beschrieben.

Ausführung.

250 ccm Urin werden mit 150 ccm Bleiessig und 5 ccm Ammoniak versetzt. — Entfernung von störendem Harnstoff usw. — Mehrstündiges Absitzenlassen. Mit Hilfe der mit doppeltem gehärtetem Filter versehenen Nutsche wird zunächst die klare, überstehende Flüssigkeit entfernt; dann wird der Niederschlag aufs Filter gebracht und mit der Saugpumpe allmählich stärker abgesogen. Von Wichtigkeit ist es, nunmehr den Niederschlag gründlich mit destilliertem Wasser auszuwaschen, mit etwa 750 ccm. Man saugt das jedesmal aufgegosene Quantum Wasser, mit dem man vorher noch das Becherglas, das den Niederschlag enthielt, ausspülte, so weit ab, bis der Niederschlag anfängt, Risse zu bekommen, nicht weiter, sonst bilden sich tiefe lange Risse, durch die das Wasser wirkungslos abfließt. Nur das letzte Wasser saugt man gründlich ab. Den Niederschlag läßt man an einem warmen Orte, in der Nähe der Heizung, so lange trocknen, bis er rissig geworden und vom Rande abgesprungen ist. Er läßt sich nun leicht mitsamt dem obersten der beiden Filtrierpapiere abheben, zusammenrollen und in den 1-Literkolben des Destillationsapparates bringen. Das zweite Papier benutzt man zum sauberen Abwischen der Nutsche, um es dann ebenfalls in den Kolben zu werfen. In diesen bringt man 100 ccm der Salzsäure und destilliert energisch. Jedesmal, wenn 30 ccm in die Vorlage übergegangen sind, läßt man von neuem 30 ccm Salzsäure durch den Hahntrichter zulaufen. Man destilliert möglichst schnell und so lange, bis die Furfurolprobe nicht mehr positiv ausfällt.

¹⁾ Berl. Bericht. 1907. 40. 4513.

Diese stellt man so an, daß man einen Tropfen des aus dem Kühler fließenden Destillates auf einen Streifen Filtrierpapier fallen läßt. Daneben bringt man einen Tropfen des Reagens 8, so daß die Ränder der Tropfen ineinander überfließen. Beim Vorhandensein von Furfurol bildet sich hier ein roter Teilring. Man muß im allgemeinen 400—500 ccm überdestillieren lassen, was in 50—60 Minuten möglich ist. Unter kräftigem Umschütteln gibt man zum Destillate eine frischbereitete Lösung von Phloroglucin in erwärmter Salzsäure (1,060). Man nimmt doppelt soviel Phloroglucin, als man Furfurolphloroglucid erwartet; mit 0,25 g wird man wohl immer auskommen. Das Destillat füllt man genau auf 400 oder 500 ccm auf; es tritt schließlich dichte schwärzliche Trübung auf. Nach 16stündigem Stehen filtriert man im Goochsehen Tiegel und wäscht aus; dieser wird vorher ausgeglüht, dann bald in das im Trockenschranke bei 98° getrocknete Wägegäschchen gestellt und nach dem völligen Abkühlen gewogen. Das Filtrieren und Auswaschen geschieht mit Hilfe einer schwachwirkenden Saugpumpe und dauert etwa 10—15 Minuten; man muß zum Auswaschen stets dieselbe Menge destillierten Wassers — genau 150 ccm — nehmen. Man läßt beim Absaugen des Waschwassers aus dem Tiegel nur so viel abfließen, daß der Niederschlag eine gut feuchte Oberfläche behält; dann fügt man neues Waschwasser hinzu und verfährt ebenso. Man vermeidet auf diese Weise die Bildung von Rissen. Es muß vorsichtig ausgewaschen und alle Salzsäure entfernt werden. Nach dem Auswaschen kommt der Goochtiegel sofort in das bereits im auf konstante Temperatur von 98—100° gebrachten Wärmeschranke stehende Wägegäschchen und bleibt dort genau 4 Stunden; dann wird das Wägegäschchen mit dem Deckel geschlossen, sofort in den Exsiccator gestellt und mit dem Tiegel nach dem Abkühlen gewogen. Das Furfurolphloroglucid ist stark hygroskopisch.

Durch Multiplikation des gefundenen Gewichtes an Furfurolphloroglucid mit 3 erhält man das Gewicht des entsprechenden Glucuronsäurelactons.

Die Gewichtszahl bedarf einer Korrektur, da eine gewisse genau berechnete Menge Phloroglucin gelöst bleibt. In 550 ccm Destillat + Waschwasser lösen sich gerade 0,0051—0,0052 g, in 650 ccm 0,0060—0,0061 g Phloroglucid. Diese Menge wäre obigem Resultate je nach der Menge des Destillates hinzuzufügen.

Beurteilung.

Diese Methode soll die allein brauchbare sein.

Das von C. Neuberg und W. Neimann¹⁾ empfohlene Verfahren der Überführung der Glykuronsäure in δ -Zuckersäure ist nach der Mitteilung des Verf. nicht für alle Fälle anwendbar.

Klinische Bestimmung der Glykuronsäure nach C. Tollens²⁾.

Prinzip.

Beruhet auf der Naphthoresorcin-Salzsäurereaktion nach B. Tollens; bei Anwendung gleicher Mengen Reagens, Urin oder verdünntem Urin erhält man eine Färbung der Ätherschicht, die proportional der Menge der im Urin vorhandenen Glykuronsäure ist.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1905. 44. 127; C. Neuberg, Der Harn. J. Springer, Berlin 1911.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 61. 109.

Wenn 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit 0,5–1 mg Glykuronsäure enthalten, dann ist in einem Reagenzglas von 13 mm lichter Weite die untere Grenze der Sichtbarkeit der Reaktion sowohl der Farbe der Ätherschicht, als auch des Absorptionstreifens erreicht.

Ausführung.

Die erste orientierende Probe stellt man mit 5 ccm Urin, 0,5 ccm der 1%igen alkoholischen Naphthoresorcinlösung, 5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewichte 1,190 in einem Reagenzglas von 13 mm lichter Weite an. Man kocht genau 1 Minute und läßt 4 Minuten absetzen. Gründliches Abkühlen unter fließendem Wasser, Ausschütteln mit 10 ccm Äther, 1 Minute stehen lassen, dann Hinzufügen von 0,5 ccm Alkohol! Fällt die Reaktion mit 5 ccm Urin stark positiv aus, nimmt man zur nächsten Reaktion 3 ccm Urin, 2 ccm Wasser, sonst dasselbe; dann 2 ccm Urin, 3 ccm Wasser; schließlich 1 ccm Urin, 4 ccm Wasser und sofort, bis die Reaktion eben noch positiv ist. Die zuletzt verwandte Urinmenge enthält dann etwa 0,5–1 mg Glykuronsäure.

Beurteilung.

Die kolorimetrische Bestimmung ist zur schnellen Orientierung über den ungefähren Glykuronsäuregehalt eines Urins nach den gefundenen Vergleichszahlen nicht ungeeignet; genaue Resultate sind natürlich mit dieser Probe nicht zu erwarten.

Eigenschaften der Glykuronsäure.

Die reine, einbasische Glykuronsäure bildet einen in Wasser und Alkohol löslichen Sirup und gibt gut krystallisierende Alkalisalze, sie dreht rechts (8–14%ige Lösung des Lactons $[\alpha]_D^{20} = +19,25^\circ$ bei 18° , mit der Verdünnung und bei erhöhter Temperatur nimmt die Drehung zu) und geht beim Kochen mit Wasser in das Lactonglykuron über, das in farblosen, bei 175 – 178° schmelzenden Tafeln krystallisiert; mit Hefe gärt sie nicht. Glykuronsäure bildet mit Barythydrat ein schwerlösliches Salz, durch Bleiessig, nicht durch Bleizucker, wird sie als basisches Salz gefällt. Gegen Fehlingsche Lösung ist das Reduktionsvermögen des Anhydrids ebenso groß, wie das der Dextrose. Alkalische Kupfer- und Wismutoxydlösungen werden, da die Glykuronsäure eine Aldehydgruppe enthält, reduziert. Beim Erhitzen mit Salzsäure zerfällt sie und bildet reichlich Furfurol. Mit Phenylhydrazin gibt die Glykuronsäure (auch schon einzelne gepaarte, z. B. die Terpen-, Menthoglykuronsäure) Verbindungen, die zum Teil in Zusammensetzung und Schmelzpunkt mit denen des Glykosazons und Pentosazons übereinstimmen (Mayer und Neuberg) und für die Erkennung der Glykuronsäure keine Verwertung finden können. Das Osazon hat einen Schmelzpunkt von 160° . Charakteristisch ist die p-Bromphenylhydrazinverbindung (S. 249), die sich von p-Bromphenylosazon der Kohlenhydrate durch ihre Unlöslichkeit in Alkohol und ihr oben erwähntes polarimetrisches Verhalten unterscheidet.

23. Die Kohlenhydrate. (Kohlehydrate.)

Unter Kohlenhydraten verstehen wir im Pflanzenreiche, in geringer Menge im Tierreiche, vorkommende stickstofffreie Körper, die neben dem Kohlenstoff Wasserstoff und Sauerstoff in dem Verhältnisse enthalten, in dem diese Wasser bilden.

Die Kohlenhydrate kann man unter Berücksichtigung der im Harn vorkommenden und bis jetzt bekannten in folgende Gruppen trennen: