

Ueber die Natur der Kohlehydrate des normalen Harns.

II. Mittheilung

Von

Dr. med. **Karl Baisch.**

(Aus dem Laboratorium von Professor Baumann, Freiburg i. B.)
Der Redaction zugegangen am 12. März 1894.)

Vor einiger Zeit habe ich den ersten Theil einer Untersuchung veröffentlicht¹⁾, welche sich mit der Natur der aus dem Harn durch Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge zu isolirenden Benzoylverbindungen beschäftigt. Dabei war es in erster Linie von Wichtigkeit, eine Reihe von Versuchen anzustellen, welche sich auf die Darstellung dieser Benzoylverbindungen, die Ermittlung der in ihnen enthaltenen Beimengungen und ihre Reinigung erstreckten.

Es ist mir damals entgangen, dass auf Veranlassung und unter Leitung von v. Udránszki G. v. Fodor²⁾ ermittelt hat, inwieweit diese Methode der Benzoylirung des Harns zu einer quantitativen Bestimmung der Kohlehydrate verwendet werden kann. Er fand es am zweckmässigsten, auf 100 cbcm. Harn 10 cbcm. Benzoylchlorid und 80—100 cbcm. 10 proc. Natronlauge zu nehmen. Er machte ferner die Beobachtung, dass die Abscheidung der Kohlehydrate eine vollständigere dadurch wird, dass man zuvor den Harn mit Wasser auf das 3—4 fache verdünnt und erst dann die Benzoylirung

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 18, S. 193.

²⁾ Festschrift für Prof. F. v. Korányi, Budapest 1891.

vornimmt. Auch gibt er den gewiss beachtenswerthen Rath, den Ueberschuss an Alkali nach Beendigung der Benzoylirung abzustumpfen. Er erklärt die dadurch erzielten grösseren und besser übereinstimmenden Ausbeuten aus dem Umstande, dass so die weitere Einwirkung der Lauge auf etwa vorhandene dextrinartige Körper, die sich sonst rasch verseifen, ausgeschaltet wird.

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschliesslich mit der Frage nach der Natur der Körper, welche jene Benzoylverbindungen eingehen.

Bezüglich der bisher vorliegenden Untersuchungen über die Benzoylverbindungen des Harns möchte ich auf den ersten Theil der Arbeit, wo auf dieselben ausführlich Bezug genommen wird, zurückverweisen. Seitdem ist eine neue Publikation über den gleichen Gegenstand von J. L. W. Thudichum erschienen, welcher, wie früher Salkowski es gethan hat, gegen die Ergebnisse der vorläufigen Untersuchungen von Wedenski Einwände bzw. Widerspruch erhebt.

Man muss anerkennen, dass Thudichum sich bemüht hat, durch eigene Untersuchungen die Natur der Benzoylverbindungen des Harns zu erforschen. Nach einem Referat in der Chemikerzeitung¹⁾ — die Originalarbeit war mir nicht zugänglich — hat er den Harn nach vorhergehender Fällung mit Natriumcarbonat und Abfiltriren mit Benzoylchlorid und Natronlauge behandelt und aus dem so erhaltenen Niederschlag dreierlei Producte gewonnen: 1. eine ölige, in kaltem Alkohol lösliche Substanz, 2. ein festes Product, welches sich erst in heissem Alkohol löste, und 3. einen auch in kochendem Alkohol unlöslichen Körper. Diese 3 Producte erklärt er sämmtlich für Abkömmlinge des Urochroms. Auch er constatirte das Vorhandensein von Stickstoff und zwar von 1,5—3%. Als er Benzoylchlorid auf eine wässrige «Urochromlösung einwirken liess, welches nach der «Eisenchloridmethode dargestellt war, erhielt er ein Product, welches 1,77% Stickstoff zeigte.

¹⁾ Chemikerzeitung, 1893, Nr. 99.

J. L. W. Thudichum hat ganz richtig erkannt, dass in der That der Benzoylniederschlag aus dem Harn aus verschiedenen Körpern besteht und keineswegs weder eine reine noch eine einheitliche chemische Verbindung darstellt, indessen ist es ihm trotz aller Bemühungen nicht gelungen, eine zuckerartige Substanz aus diesen Benzoylverbindungen abzuscheiden.

Um die Bestandtheile der Benzoylverbindungen des Harns und ihre Zusammensetzung zu ermitteln, ist es in erster Linie nöthig, aus ihnen durch Abspaltung der Benzoësäure zu den Körpern selbst zu gelangen, deren Benzoylverbindungen in jenem Gemenge vorliegen. Wie schon früher erwähnt, hat Wedenski versucht, durch Natronlauge den Ester zu verseifen und gefunden, dass dies nur unvollständig gelingt. Den Rest spaltete er mit verdünnter Schwefelsäure. Mit der ersteren Lösung erhielt er Reactionen, aus welchen er auf das Vorhandensein des thierischen Gummis von Landwehr schloss. Den mit Natronlauge nicht verseifbaren Antheil behandelte er mit verdünnter Schwefelsäure und erhielt dadurch nach Entfernung der abgespaltenen Benzoësäure durch Aether eine Lösung, die sich gegen Alkalien und alkalische Kupfer- oder Wismuthlösung wie Traubenzucker verhielt und wieder benzoylirt werden konnte, deren wirksame Substanz er deshalb auch für Traubenzucker ansprach.

Man könnte aus Wedenski's Angaben möglicherweise den Schluss ziehen, als ob die Benzoylverbindungen des Traubenzuckers durch Alkalien überhaupt nicht vollständig verseift werden könnten. Dass dies nicht der Fall ist, hat Kueny¹⁾ gezeigt, welcher das aus reinem Traubenzucker dargestellte Pentabenzooat der Einwirkung verschiedener Säuren und Alkalien unterwarf. Während Schwefelsäure und Salpetersäure keine vollständige Spaltung des Esters bewirkten, machte er die Beobachtung, dass bei Behandlung mit verdünnter Kalilauge schon beim blossen Stehen in der Kälte nach 6 Stunden eine Verseifung beginnt, die jedoch nicht zu Ende geht. Erhitzte er dagegen den Ester mit verdünnter Natronlauge auf 100°, so begann nach 10 Minuten sich eine Ein-

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 14, S. 341.

wirkung bemerkbar zu machen, die jedoch ebenfalls nicht zur völligen Zerlegung des Esters führte. In der Flüssigkeit konnte Kueny zu keiner Zeit Zucker nachweisen. Ich habe diesen Versuch in der Weise wiederholt, dass ich 5 gr. reinen Traubenzucker-Pentabenzoats mit 100 cbcm. reiner 10proc. Natronlauge auf dem Wasserbad erhitzte. Die Mischung färbte sich rasch braun und nach einer Stunde reducirte die Lösung Kupfersulfat. Die Reduktionsfähigkeit nahm zu bis zur 3. Stunde, wo sie ziemlich reichlich war und nahm von da an wieder ab, so dass nach weiteren 2 Stunden nur noch eine geringe, nach 3 Stunden gar keine Reduction mehr nachgewiesen werden konnte.

Wenn es demnach auch gelingt, mit verdünnten Alkalien den Ester zu verseifen, so wird doch vor Vollendung der Spaltung der abgetrennte Zucker weiter verändert, so dass sich speciell für meine Zwecke ein anderer Weg als zweckmässig erwiesen hat, der ebenfalls von Kueny schon angegeben wurde, nämlich die Behandlung mit Natriumäthylat. Kueny konnte in der durch Einwirkung des Natriumäthylats auf reines Traubenzucker-Pentabenzoat erhaltenen Lösung nach Entfernung der Benzoësäure starke Reduction und intensive Furfurolreaction nachweisen, ausserdem erhielt er mit Phenylhydrazin das charakteristische Glukosazon, auf dessen Beschreibung und Analyse er jedoch nicht näher eingeht. Die Verseifung war ferner eine nahezu quantitative. Denn die Lösung zeigte eine Rechtsdrehung von 48 Minuten, während er nach der Theorie 50' erwarten durfte. Auch die Gährungsfähigkeit war nicht beeinträchtigt, vielmehr vergährte die Lösung mit Bierhefe ebenso leicht, wie eine Traubenzuckerlösung von demselben Gehalte.

Bei den Spaltungen, die ich sowohl mit Traubenzuckerbenzoat, als auch mit dem aus dem Harn gewonnenen Ester vorgenommen habe, habe ich mit geringen Abänderungen, welche ich bei Besprechung der einzelnen Verseifungen jeweils erwähnen werde, stets folgenden Gang eingehalten.

Zur Herstellung des Natriumäthylats wurden auf je 10 gr. Ester 7,5 gr. metallisches Natrium, welche in 300 cbcm.

abgekühlten absoluten Alkohol eingetragen wurden, verwendet.

In diese Lösung wird nun unter beständigem Umschütteln und Abkühlen des Gefäßes in der Kältemischung der fein zerriebene Ester in Substanz allmählig eingebracht. Um weitere Veränderungen des etwa vorhandenen Zuckers zu verhüten, wurde die Verseifung immer bei einer Temperatur von -5°C ausgeführt¹⁾. Die Verseifung ist ungefähr nach 20–40 Minuten zu Ende. Dieser Punkt wird leicht erkannt dadurch, dass eine herausgenommene Probe mit dem 3–4fachen Volumen Wasser sich nicht mehr trübt, ein Zeichen, dass kein unverändertes Benzoat mehr vorhanden ist. Setzt man mehr Wasser zu, so entsteht zunächst wieder eine Trübung durch Benzoösäureäthylester, die auf weiteren Zusatz von viel Wasser jedoch ebenfalls verschwindet. Der Benzoösäureäthylester macht sich schon durch seinen obstähnlichen Geruch bemerkbar.

Die Verseifung ist insoferne keine ganz vollständige, als immerhin geringe krümliche Mengen von unverändertem Benzoat übrig bleiben. Ihre Quantität ist eine um so geringere, je feiner der Ester vorher zerrieben wurde.

Trübt sich die herausgenommene Probe nicht mehr mit Wasser, so wird sofort zur Verhinderung weiterer Einwirkung des Alkalis soviel verdünnte Schwefelsäure zugesetzt, als zur Ueberführung des verwendeten Natriums in primäres Natriumsulfat nöthig ist. Es empfiehlt sich die Verdünnung der Schwefelsäure in der Weise vorzunehmen, dass man zunächst die erforderliche Menge concentrirter Säure abwägt und dann ebensoviel cbcm. Wasser zusetzt, als vorher zur Herstellung des Aethylats Alkohol verwendet worden war.

Wenn die Benzoylverbindungen des Harns nur aus Benzoösäureestern des Traubenzuckers beständen, so würde die Mischung jetzt nur Traubenzucker, Benzoösäure und primäres Natriumsulfat enthalten.

¹⁾ Die Temperatur ist auch insofern von Bedeutung, als bei Verwendung höherer Temperatur die Verseifung ziemlich rasch, bei Temperaturen unter 0° beträchtlich langsamer erfolgt.

Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Aether wird zunächst die Benzoösäure entfernt. Man versetzt die nicht filtrirte Lösung mit etwa derselben Quantität Aether und beobachtet dabei eine gute Trennung der alkoholisch-wässrigen Schicht von der ätherischen. Doch fällt bei Verarbeitung des aus dem Harn gewonnenen Benzoylniederschlags schon jetzt auf, dass sich zwischen beiden Schichten eine mehr schleimige Schicht befindet, die bei der zweiten Ausschüttelung mit Aether erheblich zunimmt, und die reinliche Trennung der Schichten bedeutend erschwert. Durch Zusatz von Alkohol wird die Abscheidung des Aethers erleichtert. Die Emulgirung der Flüssigkeit tritt bei der 2. und 3. Aetherausschüttelung meist noch stärker hervor. Durch vorsichtigen Zusatz von geringen Mengen von Alkohol können diese Emulsionen immer in 2 Schichten getrennt werden. Im Ganzen wird dreimal mit ungefähr denselben Mengen Aether ausgeschüttelt, die einzelnen Aetherauszüge werden je mit 100 cbcm. Wasser zweimal ausgewaschen und das Waschwasser mit der wässrig-alkoholischen Lösung vereinigt, aus welcher schon während des Ausschüttelns mit Aether sich Krystalle von primärem Natriumsulfat abscheiden. Die Ausschüttelung des Aethers mit Wasser ist erforderlich, da immerhin geringe Mengen Zucker in den Wasser und Weingeist enthaltenden Aether übergehen, was man daran leicht erkennen kann, dass der Aetherrückstand, wenn er nicht mit Wasser gewaschen wurde, Kupfersulfat reducirt.

Die weingeistig-wässrige Lösung wurde nun mit Natronlauge unter Umrühren, so lange versetzt bis die Reaction eben noch deutlich sauer war. Der geringe Rest von freier Säure wurde nun mit Natriumcarbonat vollends abgestumpft¹⁾, wobei indess mit Sorgfalt darauf geachtet wurde, dass die Reaction der Lösung niemals alkalisch wurde.

Zur Entfernung des Natriumsulfats wird nun die Flüssigkeit, in welcher in der Regel schon Krystalle von Natrium-

¹⁾ Bei einigen Verarbeitungen wurde von vornherein mit Soda neutralisirt, wobei die reichliche Entwicklung der Kohlensäure für die Erkennung des neutralen Punktes sich als störend erwies.

sulfat sich abgeschieden haben, mit dem 2—3fachen Volumen Alkohol versetzt und über Nacht bei Seite gestellt.

Die vom Natriumsulfat abfiltrirte Flüssigkeit wird nun in einer flachen Schale auf schwach geheiztem Wasserbade verdunstet, wobei immer sorgfältig auf die Reaction der Flüssigkeit geachtet und dafür gesorgt wurde, dass nie alkalische Reaction eintrat und die saure Reaction nicht stärker wurde, als dass sie durch Lakmus eben angezeigt wurde. Man dampft ein, bis aller Alkohol vertrieben ist. Gibt, was bei Verarbeitung des Benzoylniederschlags aus Harn die Regel ist, eine herausgenommene Probe mit Alkohol noch eine Fällung, so versetzt man die Gesamtmenge der Lösung nochmals mit dem 4—5fachen Volum Alkohol, filtrirt ab und dampft wieder vorsichtig ein. Man erhält so eine gelb bis bräunlich gefärbte Lösung, welche zum Nachweis des Traubenzuckers direkt oder nach vorangegangener Entfärbung mit neutralem Bleiacetat weiter verwendet wurde.

Controlversuch der Verseifung von 5 gr. reinem Traubenzuckerbenzoat.

Bevor diese Methode der Verseifung auf die Benzoylverbindungen des Harns angewendet wurde, war es wichtig, durch einen besonderen Versuch auf's Genaueste festzustellen, ob bei dieser Art der Verseifung aus den Benzoësäureestern des Traubenzuckers nicht ausser dem Traubenzucker, durch eine Einwirkung des Natriumäthylats auf letzteren, Körper gebildet werden, welche Zuckerreactionen geben, ohne identisch mit dem Traubenzucker zu sein.

Kueny hat in dieser Beziehung schon festgestellt, dass das reine Pentabenzoat des Traubenzuckers durch die Behandlung mit Natriumäthylat vollständig verseift wird und der dabei gebildete Traubenzucker rasch und völlig mit Bierhefe vergäht. Es fehlt aber noch der Nachweis darüber, ob neben diesem Traubenzucker nicht unvergärbare Körper, welche Reductionsfähigkeit besaßen oder Osazon bilden konnten, ausserdem gebildet worden waren. Die Feststellung dieses Punktes ist natürlich von ganz besonderer Wichtig-

keit für die aus meinen Beobachtungen weiter unten zu ziehenden Schlussfolgerungen. Der Controlversuch wurde mit einem Gemenge von Benzoësäureestern des Traubenzuckers angestellt, welches neben Pentabenzooat auch andere Benzoësäureester enthielt und den Schmelzpunkt 162° zeigte; denn wenn im Harn Traubenzucker enthalten ist, so erhält man bei der Benzoylirung, was schon Baumann betont hat, nicht den Penta- oder Tetrabenzoylester, sondern ein Gemenge von verschiedenen Estern des Traubenzuckers.

Die Verseifung, welche genau in der früher angegebenen Weise vorgenommen wurde, ergab, dass diese Spaltung glatt und vollständig erfolgt war.

Es wurden nach der Abdunstung des Alkohols 25 ccm. einer schwach sauer reagirenden klaren, gelblich gefärbten Flüssigkeit erhalten, welche Fehling'sche Lösung stark reducirte.

Diese 25 ccm. wurden mit wenig geschlemmter Hefe über Quecksilber aufgestellt und zur Controle in einer zweiten Röhre 20 ccm. einer 1 proc. Traubenzuckerlösung, sowie in einer dritten Röhre Hefe allein angesetzt.

Nach ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde beginnen die ersten beiden Röhren etwa gleichzeitig zu gähren. Die durch Verseifung gewonnene Lösung der ersten Röhre gährt jedoch viel rascher: nach 3 Stunden hatten sich schon ca. 25 ccm. Kohlensäure gebildet. Nach 24 Stunden ist die Gährung in beiden Röhren beendigt.

Die vergohrenen Flüssigkeiten werden herausgenommen und filtrirt und es muss als wichtig hervorgehoben werden, dass keine von beiden Lösungen reducirte oder ein Glukosazon lieferte. Die Vergährung der durch Verseifung ihres Benzoylesterns gewonnenen Traubenzuckerlösung ist also ebenso vollständig verlaufen, wie diejenige von reinem Traubenzucker.

Verseifung der Benzoylverbindungen aus dem Harn.

Es ist ausdrücklich zu bemerken, dass zur Gewinnung der Benzoylverbindungen nur solcher Harn verwendet wurde.

bei welchem die Trommer'sche Probe mit Natronlauge und Kupfersulfat negativ ausfiel. Dieser Harn, welcher von Praktikanten des Laboratoriums stammte, wurde in Portionen von je 5 l nach Ausfällung der Phosphate mit Natronlauge mit den entsprechenden, früher angegebenen Mengen von Benzoylchlorid und Natronlauge versetzt, bis zum Verschwinden des Geruchs nach Benzoylchlorid geschüttelt, die Niederschläge nach dem Absitzen abfiltrirt, ausgewaschen, noch bevor sie ganz trocken waren, mit verdünnter Salzsäure zerrieben, bis zum Verschwinden der Salzsäurereaction im Filtrat ausgewaschen und getrocknet. Es ist einer der grössten Vortheile der Benzoylchloridmethode, dass sie es ermöglicht, die geringen Mengen von Zucker in jedem Harn mit wenigen Verunreinigungen zu isoliren und in haltbarem Zustande aufzusammeln.

Zur Verseifung wurden jeweils 20 gr. des gereinigten Estergemenges verwendet. Dabei wurde immer nach dem oben geschilderten Gange verfahren. Wenn trotz dieser gleichmässigen Behandlung der einzelnen zu verseifenden Portionen Differenzen in den Resultaten zu Tage traten, so ist dieser Umstand zu erklären aus dem wechselnden Gehalt des Esters bzw. des Harns an denjenigen Substanzen, welche an der Benzoylchloridreaction betheiligt sind. Im Ganzen wurden ungefähr 200 gr. der aus dem Harn gewonnenen Benzoylverbindungen verarbeitet.

Der Verlauf des Verseifungsprocesses war übereinstimmend mit demjenigen der Benzoylverbindungen des reinen Traubenzuckers, dagegen zeigte sich bei der weiteren Verarbeitung, insbesondere bei dem Punkte derselben, wo die abgespaltene Benzoësäure aus der angesäuerten Flüssigkeit durch Schütteln mit Aether entzogen werden muss, die Erscheinung, welche schon oben kurz erwähnt worden ist. Während früher bei der Verwendung von Benzoyltraubenzucker die Benzoësäure durch Aether sehr leicht und vollständig entfernt werden konnte, ergaben sich hierin Schwierigkeiten bei der Verarbeitung der Benzoylverbindungen des Harns und zwar dadurch, dass die mit Aether ausgeschüttelte Flüssigkeit sich häufig in eine schleimige Masse verwandelte. Die Aether-

schicht konnte infolgedessen nur dadurch abgetrennt werden, dass man nicht unbeträchtliche Mengen von Alkohol hinzusetzte. Dadurch wurde wieder bedingt, dass wegen des grösseren Alkoholgehaltes des Aethers nicht unerhebliche Mengen der Kupferoxyd reducirenden Substanzen in den Aether übergingen. Um diese Quantitäten der Verseifungsproducte nicht zu verlieren, war es geboten, den Aetherauszug wiederholt mit kleinen Mengen von Wasser auszuschütteln, wodurch die in Aether gelöste zuckerartige Substanz demselben wieder entzogen wurde. Die Ursache der vollständigen Emulgirung beim Ausschütteln der Flüssigkeit mit Aether ist ohne Zweifel dieselbe, welche jener Emulgirung zu Grunde liegt, die man in mehr oder minder starkem Grade auch beim Ausschütteln von frischem oder eingedampftem Harn mit Aether so oft beobachtet. Es verdient bemerkt zu werden, dass die Substanz, durch welche die Emulgirung bedingt wird, in die unlösliche Benzoylverbindung, die aus dem Harn gewonnen wird, übergeht. Von diesem Körper, der nicht als Mucin anzusehen ist und keine Eiweissreactionen gibt, wird weiter unten bei der dextrinartigen Substanz des Harns (thierisches Gummi) die Rede sein.

Im Uebrigen verlaufen die Verseifungen einander ziemlich ähnlich und es lagen nun verschiedene Möglichkeiten vor, die durch die Verseifung gewonnenen Lösungen weiter zu verarbeiten. Die Aufgabe war klar vorgezeichnet: es galt, das Reductions-, das Gährungs-, das Drehungsvermögen und die Bildung von Glukosazon zu prüfen und womöglich auch zu bestimmten Anschauungen über die quantitativen Beziehungen dieser verschiedenen Reactionen zu einander zu gelangen.

I. Traubenzucker.

Darstellung des Glukosazons aus den Benzoylverbindungen des Harns.

20 gr. des Estergemenges wurden mit 600 cbcm. absolutem Alkohol, in welchem 15 gr. metallisches Natrium gelöst waren, verseift. Die nach Entfernung der Benzoësäure und der Sulfate eingedampfte Lösung, die ziemlich stark braun

gefärbt war, wurde behufs Entfärbung und zur Entfernung von Beimengungen mit neutralem, dann mit basischem Bleiacetat versetzt. Der dadurch gebildete nicht unbeträchtliche Niederschlag wurde abfiltrirt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt und nach Durchleiten von Kohlensäure vom Schwefelblei abfiltrirt. Von den in dem Bleiniederschlag enthaltenen Substanzen wird später die Rede sein.

Die nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff fast völlig entfärbte Lösung wurde auf 100 ccm. verdünnt. Sie zeigte in der 2 dm. langen Röhre eine Rechtsdrehung von 1° , was einer Traubenzuckerlösung von ca. 1% entsprechen würde.

Zu dieser Lösung wurde nun hinzugefügt eine filtrirte Mischung von Phenylhydrazin 7,0, Natriumacetat (25 proc. Lösung) 20,0, Essigsäure 50,0 und das Ganze auf dem Wasserbade erhitzt.

Nach ungefähr 10 Minuten trübte sich die Flüssigkeit und es schieden sich makroskopisch sichtbare Krystalle aus, deren Menge beim Erkalten so zunimmt, dass die ganze Flüssigkeit davon erfüllt erscheint. Unter dem Mikroskop erwiesen sie sich als lange, feine, gelbe Nadeln, die radienförmig angeordnet sind und keinerlei amorphe Beimengungen zeigen. Sie wurden abfiltrirt und die Lösung ohne weiteren Zusatz von Phenylhydrazin aufs Neue auf dem Wasserbade erhitzt. Nach weiteren 20 Minuten schieden sich wieder gelbe Krystalle desselben Aussehens ab, die mit dem ersten Niederschlag vereinigt nach dem Trocknen 0,444 gr. wogen.

Ein dritter, vierter und fünfter Niederschlag nach $\frac{1}{2}$, bzw. 1 und $2\frac{1}{2}$ Stunden Erhitzen gewonnen, zeigen stark amorphe Beimengungen. Die Gesamtabcheidung betrug 0,750 gr.

100 ccm. einer 1 proc. reinen Traubenzuckerlösung in genau derselben Weise mit Phenylhydrazin, Natriumacetat und Essigsäure behandelt, lieferten dagegen 1,5 gr. Phenylglukosazon. Auch hierbei liess sich die Wahrnehmung machen, dass nach Abfiltriren des zuerst entstandenen Niederschlages bei weiterem Erhitzen noch eine Ausscheidung von allerdings verunreinigtem Glukosazon eintritt.

Die ersten beiden Niederschläge des aus der Verseifung gewonnenen Glukosazons erwiesen sich als völlig rein. Es färbte sich bei ca. 200° dunkel und schmolz unter Gasentwicklung bei 204—205°. Dies ist nach E. Fischer¹⁾ die Schmelztemperatur des reinen Glukosazons.

Da trotz der Uebereinstimmung der Schmelzpunkte die Möglichkeit doch nicht völlig ausgeschlossen war, dass ein in der Zusammensetzung von dem Glukosazon verschiedener Körper vorlag, wurde auch eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

Dieselbe ergab aus 0,1234 gr. Substanz 16,7 cbcm. Stickstoff bei 16° und 751 mm. Barometerstand, entsprechend 15,58% N.

	Berechnet:	Gefunden:
N	15,64	15,58

Das Ergebniss der Analyse zeigt, was durch die Schmelzpunktbestimmung bestätigt wird, dass reines Phenylglukosazon vorlag.

Es ist im Vorstehenden gezeigt worden, dass aus 20 gr. der Benzoylverbindungen des Harns 0,750 gr. Glukosazon erhalten werden. Für den Nachweis, dass aus diesen Benzoylverbindungen überhaupt Glukosazon erhalten werden kann, ist es natürlich nicht nöthig, 20 gr. des Estergemenges zu verwenden, zu dessen Darstellung etwa 10 l Harn erforderlich sind. Es gelingt vielmehr in jedem Fall reines Glukosazon nach dem geschilderten Verfahren abzuscheiden, wenn nur ein gr. des Benzoylestern aus dem Harn verarbeitet wird. Zu der Verseifung sind in diesem Falle nur 0,7 gr. Natrium nöthig, welche in 30 cbcm. Alkohol gelöst werden. Ist die Verseifung zu Ende, was nach kurzer Zeit der Fall ist, so wird die Lösung mit Essigsäure im Ueberschuss versetzt, durch Schütteln mit Aether die Bensoësäure entfernt, filtrirt und der Alkohol abgedunstet. Nun wird mit Bleiacetat gefällt, das Filtrat entbleit und mit einigen cbcm. Phenylhydrazin und überschüssiger Essigsäure auf dem Wasserbade erhitzt. Nach

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 17, S. 579.

ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde bilden sich besonders beim Erkalten die charakteristischen gelben Nadeln des Glukosazons.

Ich habe mich durch besondere Versuche überzeugt, dass bei jeder Verarbeitung der Benzoylverbindungen aus dem durchaus normalen Harn junger, gesunder Männer ausnahmslos durch die früher geschilderte Methode reines Glukosazon gewonnen werden kann. Es ist danach ausser Frage, dass ein Zucker, welcher Glukosazon liefert, ein Bestandtheil des normalen Harns ist.

Wie bekannt, ist hauptsächlich v. Jaksch¹⁾ zuerst für die ausgezeichnete Verwerthbarkeit der Osazonreaction im Harn eingetreten. Er gibt in seinem vortrefflichen Buch der klinischen Diagnostik²⁾ die Vorschrift zur direkten Anstellung der Phenylhydrazinprobe im normalen Harn. v. Jaksch, der wie wohl die Mehrzahl der heutigen Kliniker eine geringe Glykosurie als einen normalen Zustand anerkennt, rühmt es der Phenylhydrazinprobe nach, dass sie im Stande sei, noch einen Gehalt von 0,1% Zucker mit Sicherheit nachzuweisen. Aus normalem Harn haben v. Jaksch und Hirschl³⁾ keine Glukosazonkrystalle erhalten und v. Jaksch meint daher, «wenn nur Spuren von Zucker im Harn vorhanden seien», so werde man bei der nach seiner Vorschrift angestellten Probe einzelne Glukosazonkrystalle niemals vermissen.

Darnach hält v. Jaksch die Phenylhydrazinreaction für diejenige Probe, welche vorzugsweise im Stande ist, die gewiss schwierig festzustellende Grenze jederzeit mit Sicherheit anzuzeigen, wo das Normale aufhört und das Pathologische beginnt. Ganz abgesehen von der Thatsache, dass es auf dem oben angegebenen Wege gelingt, aus jedem normalen Harn Osazonkrystalle in vollendeter Reinheit zu gewinnen, stehen diesen Beobachtungen und Schlüssen v. Jaksch's und Hirschl's doch auch gegentheilige Mittheilungen gegenüber. So stellte Schilder⁴⁾ schon 1886 aus normalem Harn

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Medicin 1886, S. 20 ff.; Prager med. Wochenschr. 1892, Nr. 30—33.

²⁾ v. Jaksch, klin. Diagnostik, III. Aufl., S. 325, 330.

³⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 14, S. 382.

⁴⁾ Wiener med. Blätter, Bd. 9, S. 13.

Osazonkrystalle dar, bei denen allerdings die Möglichkeit, dass es eine Verbindung der Glykuronsäure sei, nicht völlig ausgeschlossen war, Moritz¹⁾ jedoch hat bei der Untersuchung vieler normaler Harnen Phenylglukosazonkrystalle fast niemals vermisst und Roos²⁾ hat einige Jahre später den Harn von 16 gesunden jungen Männern genau nach der von v. Jaksch angegebenen Methode untersucht und in jedem Falle unverkennbare Glukosazonkrystalle erhalten.

Natürlich wird der Ausfall der Phenylhydrazinprobe des Harns, d. h. die grössere oder geringere Menge abgeschiedenen Osazons, immer einen gewissen Anhaltspunkt für die Beurteilung des Zuckergehalts im Harn an die Hand geben, insofern man mit dieser Probe leicht erkennen kann, ob eine merkliche Steigerung des normalen Zuckergehalts im gegebenen Fall vorliegt.

Die Einwände, welche Kistermann³⁾ und Andere gegen die Brauchbarkeit der Phenylhydrazinprobe in der von v. Jaksch angegebenen Weise erhoben haben, mit der Begründung, dass sie zu einer Verwechslung der Glukosazonkrystalle mit der von Thierfelder⁴⁾ aus der Glykuronsäure dargestellten Phenylhydrazinverbindung führen könne, kommen für den von mir geführten Nachweis überhaupt nicht in Betracht, denn die Benzoylverbindungen sind aus dem Harn unter Bedingungen abgeschieden worden, unter welchen, wie Thierfelder gezeigt hat, die Glykuronsäure keine unlösliche Benzoylverbindung liefert.

Der Beweis für das Vorhandensein von Traubenzucker im normalen Harn ist natürlich durch die Bildung von Glukosazon nicht völlig erbracht, da Fructose und andere z. Th. erst synthetisch dargestellte Zucker, wie E. Fischer gezeigt hat, dasselbe Glukosazon liefern. Es bedurfte daher noch der weiteren Feststellung, dass der aus dem Harn gewonnene

1) Münchn. med. Wochenschr. 1889, Nr. 16.

2) Roos, über das Vorkommen von Kohlehydraten im Harn von Thieren. I.-D. Freiburg, 1891.

3) Arch. f. klin. Medicin, 50, S. 423.

4) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 11, S. 397.

Zucker gährungsfähig ist und rechts dreht, dass ferner die Rechtsdrehung bei der Vergärung verschwindet und dass er in dem Verhältniss zur Rechtsdrehung und zum Gährungsvermögen ein entsprechendes Reductionsvermögen für alkalische Kupferlösung besitzt. Für diese Feststellung wurden weitere Portionen des Benzoylestere aus dem Harn verarbeitet, worüber im folgenden weiter berichtet wird.

Gährung, optisches Verhalten und Reductionsvermögen des Zuckers aus normalem Harn.

Bei sämtlichen Verseifungsversuchen, bei denen auf das optische Verhalten der gewonnenen Lösung geachtet wurde, konnte stets eine deutliche, messbare Rechtsdrehung constatirt werden. So drehte die 100 ccm. betragende Lösung, aus welcher das eben beschriebene Glukosazon gewonnen wurde, in der 2 dm. langen Röhre 1 Grad rechts. Bei einer anderen Bestimmung der Drehung einer 160 ccm. betragenden Lösung wurde für die 2 dm. lange Röhre 18 Minuten, bei einer dritten 35 ccm. betragenden in derselben Röhre 65 Minuten abgelesen. Legen wir der Berechnung des Zuckergehalts die spezifische Drehung des wasserfreien Traubenzuckers in wässriger Lösung zu Grunde, ($52,5^\circ$) so stellte die erste dieser Lösungen eine 0,95 proc., die zweite eine 0,29 proc., die dritte eine 1,03 proc. Zuckerlösung dar.

Bei allen diesen Untersuchungen des Drehungsvermögens leistete die vorhergehende Fällung mit neutralem und basischem Bleiacetat für die Entfärbung insoferne vortreffliche Dienste, als nach der Entfernung des überschüssigen Bleis mittelst Schwefelwasserstoff meist eine nur ganz schwach gelb gefärbte, für die Untersuchung im Polarisationsapparate gut verwendbare, klare Flüssigkeit erhalten wurde.

Was sodann die Ermittlung des Gährungsvermögens dieser rechtsdrehenden, glukosazonliefernden Lösungen anlangt, so wurde auch hierüber eine Reihe von Versuchen angestellt. Die neutralen oder schwach sauren Lösungen wurden mit wenig geschlemmter Hefe über Quecksilber aufgestellt. Zur Controle wurden jeweils reine Traubenzuckerlösungen von

dem durch Drehung oder Reduction ermittelten Gehalte der zu untersuchenden, aus Harn gewonnenen Lösung ebenfalls mit Hefe über Quecksilber angesetzt. Es zeigte sich, dass die durch Verseifung erhaltene Lösung sich in Bezug auf ihr Gährungsvermögen von einer reinen Traubenzuckerlösung in keinem wesentlichen Punkte unterschied. Die Gährung begann bald gleichzeitig, bald in der einen, bald in der andern früher. Das eine Mal entwickelte die aus Harn gewonnene Zuckerlösung, das andere Mal die Controlflüssigkeit rascher Kohlensäure und ebenso zeigten sich in der Zeitdauer, welche die einzelnen Lösungen zur völligen Vergährung, d. h. bis zum Aufhören von Gasentwicklung bedurften, geringe Differenzen. Wesentliche Unterschiede wurden jedoch, wie gesagt, bei der Gährung selbst nicht beobachtet.

Es galt nun, die quantitativen Beziehungen zwischen Gährung und Drehung zu ermitteln und es wurden zu diesem Zweck 20 cbcm. einer aus Harn gewonnenen Zuckerlösung, welche nach der Drehung eine 0,5 proc. Traubenzuckerlösung repräsentirte, mit Hefe über Quecksilber aufgestellt.

In einer zweiten Röhre wurden 20 cbcm. einer 0,5 proc. reinen Traubenzuckerlösung ebenfalls mit Hefe angesetzt.

Um eine durch etwaige Selbstgährung der Hefe entstehende Fehlerquelle auszuschliessen, wurde in eine dritte Röhre Hefe allein gebracht.

Die erste Röhre, die aus Harn gewonnene Zuckerlösung enthaltend, lieferte 11 cbcm., der Controlversuch 14 cbcm. Kohlensäure. Danach entspräche der durch die Gährung ermittelte Gehalt jener 20 cbcm. dem einer 0,4 proc. Traubenzuckerlösung.

Die quantitativen Resultate der Gährung und Drehung dürfen demnach als annähernd übereinstimmend betrachtet werden.

Von den Reactionen des Traubenzuckers bleibt uns jetzt nur noch die Reduction zu besprechen übrig. Eine solche kann in der durch Verseifung des Benzoylestern aus Harn gewonnenen Flüssigkeit noch während der Einwirkung des

Natriumäthylats auf den Ester mit Leichtigkeit nachgewiesen werden.

Mehr als der qualitative Nachweis interessirt uns daher die Beziehung der quantitativen Ergebnisse des Reductionsvermögens zu den durch Drehung oder Gährung ermittelten Werthen.

Zu diesem Zweck wurden 25 gr. Benzoyl ester des Harns verarbeitet.

Die auf 35 ccm. eingeeengte Zuckerlösung, die etwas gelb gefärbt, aber völlig klar war, zeigte in der 1 dm. langen Röhre eine Rechtsdrehung von ca 30 Minuten, entsprechend einer 0,95 proe. Traubenzuckerlösung.

15 ccm. dieser Lösung wurden auf's zehnfache verdünnt. Davon waren 51 ccm. erforderlich, um 20 ccm. frisch bereiteter Fehling'scher Lösung zu reduciren. Die Bestimmung mittelst Reduction ergibt somit einen Gehalt an Traubenzucker von 1,96 %.

Wie man sieht, stellt der durch Titration ermittelte Werth fast genau das Doppelte des aus der Drehung berechneten dar. Auch andere Bestimmungen haben dieses Ueberviegen des Reductionsvermögens über das Drehungs- und über das Gährungsvermögen durchaus bestätigt.

Diese Thatsache lässt sich nur durch zweierlei Annahmen erklären: entweder es ist in der ursprünglichen Lösung eine linksdrehende, reducirende Substanz vorhanden, welche die Rechtsdrehung vermindert oder ein nicht gährender, reducirender Körper. Wäre die erstere Annahme richtig, so müsste nach der Gährung eine Linksdrehung auftreten. Eine solche ist aber niemals beobachtet worden. Es bleibt somit nur die Annahme eines nichtgährungsfähigen, reducirenden Kohlehydrats übrig. Auf dasselbe wird weiter unten näher eingegangen werden.

Hier soll als Ergebniss der bisherigen Untersuchung zusammenfassend betont werden, dass aus den geschilderten Reactionen: der Reduction von Kupfersulfat in alkalischer Lösung, des in den quantitativen Ergebnissen übereinstim-

menden Gährungs- und Drehungsvermögens, sowie endlich der Bildung von Phenylglukosazon, sich mit Nothwendigkeit die Schlussfolgerung ergibt, dass in den untersuchten Lösungen Traubenzucker enthalten war, mit anderen Worten, dass Traubenzucker ein constanter Bestandtheil jedes normalen Harns ist.

Die Versuchung liegt nahe, aus den gewonnenen Resultaten bestimmte Zahlen für die Mengenverhältnisse abzuleiten, in denen der Traubenzucker bezw. die reducirenden Substanzen, soweit sie Kohlehydrate sind, im normalen Harn auftreten. Gibt es doch gerade für die reducirenden Substanzen des Harns, soweit sie zu den Kohlehydraten gehören, zum Leidwesen aller Kliniker wohl kaum eine zuverlässige Methode der quantitativen Bestimmung, die besonders auch Harnsäure, Kreatinin, Glykuronsäure und eine Reihe anderer Körper mit Sicherheit ausschliesst. Trotzdem die Benzoylchloridmethode in diesem Sinne, wenn ich so sagen darf, einen exclusiven Charakter an sich hat und es auf dem Wege der Verseifung auch ermöglicht, die reducirenden Kohlehydrate von den nichtreducirenden zu trennen (eine Thatsache, auf die wir sogleich zu sprechen kommen werden), ja sogar den Traubenzucker von den übrigen reducirenden Kohlehydraten zu trennen, so lehrt doch eine kurze Erwägung, dass an eine quantitative Bestimmung der Kohlehydrate des Harns, der reducirenden sowohl, wie der nicht reducirenden, ernstlich nicht gedacht werden kann. Meine eigenen Versuche sind viel zu wenig umfangreich, um derartige Schlussfolgerungen zu gestatten; aber auch die Methode an sich ist schon deshalb für diese Zwecke unzureichend, da bei der Verseifung des Benzoylniederschlags Verluste unvermeidlich sind. Immerhin wäre es nicht ohne Interesse, die aus grösseren Versuchsreihen ermittelten Resultate kennen zu lernen, da ja die gefundenen Mengen jedenfalls die Minimalwerthe darstellen.

v. Udranszki¹⁾), der sich um die Lösung dieser Fragen so grosse Verdienste erworben hat, suchte diesen Verhält-

¹⁾ v. Udranszki, über die periodischen Schwankungen der phys. Kohlehydratausscheidung, Festschrift für Korányi, Budapest 1891.

nissen näher zu kommen, indem er die Furfurolreaction mit der Reduction combinirte. Er fällte zur Entfernung von Harnsäure und Kreatinin den Harn mit Phosphorwolframsäure und bestimmte nun mittelst Fehling'scher Lösung den Gehalt an reducirenden Substanzen. Er fand so als Tagesquantität der ausgeschiedenen Kohlehydrate 1,9997 bis 2,8177 gr. Da sich jedoch Reduction und Furfurolreaction nicht decken, so liesse sich vielleicht auf diesem Wege zu bestimmten Zahlen über das Verhältniss der reducirenden zu den nicht reducirenden Kohlehydraten des Harns gelangen.

Ich habe erhalten:

I. aus 10 Liter	0,95 gr.	} Traubenzucker, durch Drehung ermittelt.
II. » 10 »	0,48 »	
III. » 12 »	0,36 »	
IV. » 10 »	0,6 »	
V. » 10 »	0,6 »	
VI. » 12 »	1,9 »	
		} reducirende Kohlehydrate ¹⁾ , durch Titration mit Fehling ermittelt.

Auf eine Tagesausscheidung von 2 Liter Harn umgerechnet, erhalte ich somit folgende Werthe:

tägliche Ausscheidung von Traubenzucker:

0,18 gr. — 0,10 gr. — 0,08 gr.

tägliche Ausscheidung von reducirenden Kohlehydraten:

0,32 gr. — 0,12 gr. — 0,12 gr.

Diese Werthe sind erheblich kleiner, als die von v. Udránszki gefundenen, übersteigen aber immer noch die Angaben von Seegen²⁾, welcher der Ansicht ist, dass der normale Harn nicht mehr als allerhöchstens 0,006% Zucker enthalte.

II. Dextrinartige Substanz des Harns (thierisches Gummi).

Durch die bisher beschriebenen Versuche ist der Beweis, dass Traubenzucker ein normaler Bestandtheil des menschlichen Harns sei, vollständig und in unanfechtbarer Weise geliefert. Selbstverständlich soll damit die Bedeutung der für diese

¹⁾ Die Kohlehydrate in IV, V und VI bestehen aus Traubenzucker und dem nichtgährenden, aber reducirenden Kohlehydrat auf Traubenzucker bezogen.

²⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 9, S. 322

Annahme von anderer Seite geltend gemachten Erfahrungen und Thatsachen nicht unterschätzt werden. Es ist also die von Wedenski aufgestellte, aber nicht ausreichend bewiesene Behauptung bestätigt, dass dieses Estergemenge Traubenzucker enthalte. Wie schon mehrfach erwähnt, hat Wedenski noch auf ein weiteres, in dem Benzoylniederschlag enthaltenes Kohlehydrat aufmerksam gemacht, das er nach den damit angestellten Reactionen für « thierisches Gummi » zu halten geneigt war.

Er liess verdünnte Natronlauge in der Hitze längere Zeit auf den Benzoylester einwirken und fand, dass die vom nicht-verseiften Reste abfiltrirte Lösung mit Alkohol eine Fällung gab. Diesen Niederschlag löste er in Wasser auf, kochte mit verdünnter Schwefelsäure und constatirte, dass nunmehr die Lösung Kupfersulfat reducirte.

Salkowski hat besonders auch diesen Theil der Wedenski'schen Untersuchungen seiner abfälligen Kritik unterzogen und den Beweis für das Vorhandensein von « thierischem Gummi » als nicht erbracht erklärt.

Man begegnet nun bei jeder mit Natriumäthylat vorgenommenen Verseifung des Benzoylniederschlags aus Harn einer dextrinartigen Substanz.

Hat man nämlich in der durch Verseifung des Harnbenzoats gewonnenen, mit Schwefelsäure versetzten Lösung mit Alkohol die Salze gefällt und abfiltrirt, und dampft nun die alkoholische Lösung weiter ein, so macht sich bei einem gewissen Grad der Concentration eine Ausscheidung von amorphen, bräunlichen Massen bemerkbar. Versetzt man nun noch einmal mit viel starkem Alkohol, so entsteht wieder eine nicht unbeträchtliche Fällung, die neben krystallinischen Substanzen auch amorphe Beimengungen erkennen lässt. Die Filtration dieses zweiten Alkoholniederschlags erfolgt auffallend langsam, sie wird jedoch erleichtert durch längeres Erwärmen auf dem Wasserbade und nachheriges Stehenlassen. Der Niederschlag löst sich zum grössten Theile in heissem Wasser und wird aus dieser Lösung durch Alkohol wieder amorph abgeschieden. Die wässrige Lösung reducirt Kupfersulfat in

alkalischer Lösung auch nach längerem — bis halbstündigem — Kochen nicht im geringsten, wohl aber gibt sie eine intensive Furfurolreaction, die sich auch durch ihr spektroskopisches Verhalten mit Sicherheit als solche nachweisen lässt. Eiweissreactionen gibt die Lösung des Niederschlags nicht, weder ist mit Essigsäure und Ferrocyankalium eine Fällung noch beim Kochen mit Millon's Reagens die charakteristische Rothfärbung zu erzielen.

Dagegen ist als wichtigste Eigenschaft dieses Körpers hervorzuheben, dass derselbe durch längeres Kochen mit verdünnter Schwefelsäure in eine Kupfersulfat reducirende Substanz verwandelt wird. Erhitzt man nämlich den durch mehrmaliges Lösen in Wasser und Ausfällen mit absolutem Alkohol nach Möglichkeit gereinigten Niederschlag mit dem dritten Theil verdünnter etwa 14proc. Schwefelsäure auf dem kochenden Wasserbad, so lässt sich nach einer Viertelstunde noch keinerlei Einwirkung constatiren. Entnimmt man dagegen nach einer weitem Viertelstunde eine Probe und erhitzt wieder mit Fehling'scher Lösung so tritt nach minutenlangem Kochen eine geringe, aber deutliche Ausscheidung von rothem Kupferoxydul auf. Diese Fähigkeit, Kupfersulfat zu reduciren, nimmt von Viertelstunde zu Viertelstunde in augenfälliger Weise zu, so dass nach ca. dreistündigem Kochen mit Schwefelsäure eine sehr beträchtliche Reductionswirkung nachzuweisen ist.

Da Untersuchungen vorliegen, welche dafür zu sprechen scheinen, dass im menschlichen Harn auch Glykogen¹⁾ auftreten kann, so wurde eine Probe der in Wasser gelösten Substanz mit einigen chem. schwacher Jodlösung versetzt, es ergab sich jedoch keinerlei charakteristische Färbung. Ausserdem ist Glykogen durch Kochen mit Schwefelsäure ungleich rascher zu verzuckern. Eine Lösung von 0,5 gr. Glykogen in 50 ccm. Wasser, mit 15 ccm. 14proc. Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, zeigte schon nach 10 Minuten eine sehr erhebliche Reduction der Fehling'schen Lösung.

¹⁾ Reichard, Archiv der Pharm. 5, 502. Leube, Virchow's Archiv, 113, 391.

Es ist unzweifelhaft, dass auf diesem Wege der Isolirung des in Rede stehenden Körpers grosse Verluste kaum zu vermeiden sind. Denn auf der einen Seite ist derselbe in Alkohol, wenn auch nur in geringem Grade löslich, auf der andern Seite werden jedenfalls schon bei der ersten Fällung der verseiften Lösung mittelst Alkohol erhebliche Mengen dieser Substanz niedergeschlagen, gehen aber in der grossen Menge von Salzen, von denen sie wegen der gleichen Löslichkeitsverhältnisse schwer zu isoliren sind, verloren. Auf eine quantitative Bestimmung des Körpers musste daher verzichtet werden.

Immerhin kann es keinem Zweifel unterworfen sein, dass dieser in Wasser lösliche, in Alkohol unlösliche Körper, der keinerlei Reduction der Fehling'schen Lösung, wohl aber eine sehr starke, auch spektroskopisch sichergestellte Furfurolreaktion gibt und ausserdem mit Schwefelsäure längere Zeit gekocht Kupfersulfat in alkalischer Lösung reducirt — es kann, wie gesagt, nicht zweifelhaft sein, dass wir hier eine dextrinartige Substanz vor uns haben.

Wir erhalten somit auch auf diesem Wege eine Bestätigung der Wedenski'schen Angaben. Einstweilen hat eine erneute Nachprüfung seiner Mittheilungen zunächst ihre Richtigkeit bestätigt. Die Wedenski'schen Angaben lassen dem, der seine Untersuchungen wiederholen will, einen gewissen Spielraum, was die Wahl der Concentration der zu verwendenden Spaltungsmittel und die Dauer ihrer Einwirkung auf den Ester anlangt. Bei der Nachprüfung seiner Ergebnisse wurde in der Weise vorgegangen, dass 12 gr. aus Harn gewonnen Benzoylestern mit 150 cbcm. Wasser und 100 cbcm. 12proc. Natronlauge eine halbe Stunde auf dem kochenden Wasserbade erhitzt wurden. Die stark braun gefärbte Lösung wird von dem unverseiften Ester abfiltrirt, das Filtrat mit concentrirter Essigsäure angesäuert und mit Alkohol versetzt. Es entsteht eine nicht unbeträchtliche Trübung und bei längerem Erwärmen auf dem Wasserbad scheiden sich amorphe, flockige Massen ab, die z. Th. an den Glaswänden kleben bleiben. Dieselben werden abfiltrirt, was rasch und leicht erfolgt, der

Niederschlag und die am Glase haftenden Mengen in wenig heissem Wasser gelöst und auf's neue mit viel Alkohol gefällt. Auch diesmal erfolgt die Abscheidung in der nämlichen Weise. Der Niederschlag wird wieder in Wasser gelöst und ist stark braun gefärbt, so dass auf eine Bestimmung etwa vorhandener optischen Verhaltens verzichtet werden musste. Dagegen gibt die Lösung sehr starke Furfurolreaction und mit Kupfersulfat und Natronlauge einen blauen, flockigen Niederschlag, der sich auch beim Erhitzen nicht schwärzte. Eine Reduction von Kupfersulfat tritt dagegen auch bei lange fortgesetztem Kochen selbst nicht in Spuren auf.

Die Lösung, die noch Salze, vor allem Phosphate enthält, wurde nun mit verdünnter Schwefelsäure behandelt, in der Weise, dass auf 50 ccm. der Lösung 15 ccm. 12proc. Schwefelsäure zugesetzt wurden. Beim Erhitzen auf dem Wasserbade scheidet sich eine geringe Menge brauner, amorpher Substanzen aus, die insofern Aehnlichkeit mit den von v. Udránszki beschriebenen Huminsubstanzen haben, als sie in Alkalien löslich sind. Dieselbe Ausscheidung wurde übrigens genau in der gleichen Weise auch bei dem oben beschriebenen, mit Alkohol aus der verseiften Lösung gefällten Körper beobachtet.

Von der mit Schwefelsäure kochenden Flüssigkeit wurden von Viertelstunde zu Viertelstunde Proben entnommen und auf ihre Fähigkeit, Kupfer zu reduciren, geprüft. Nach der ersten Viertelstunde war keinerlei Reduction der Fehling'schen Lösung nachzuweisen, wohl aber trat dieselbe in geringem Grade nach einer halben Stunde auf und nahm von diesem Zeitpunkt an langsam aber stetig zu. Während die Reduction Anfangs nur nach längerem Kochen eintrat, erfolgte sie nach dreistündiger Einwirkung der Schwefelsäure rasch und reichlich. Auch bei der Verwendung des Nylander'schen Reagens trat nach kurzem Kochen eine Reduction und Schwarzfärbung auf.

Es ist keine Frage, dass der durch Natronlauge nach dem Wedenski'schen Verfahren abgespaltene Körper identisch ist mit der oben beschriebenen, durch Natriumäthylat ge-

wonnenen und durch Alkohol gefällten dextrinartigen Substanz. Dies ist bewiesen durch die gleichen Löslichkeitsverhältnisse und das gleiche Verhalten gegen α -Naphthol und Schwefelsäure, wie gegen alkalische Kupfer- und Wismuthlösung.

Sieht man sich in der Literatur nach einem, als im normalen Harn vorhandenen, beschriebenen Körper um, mit dem diese Substanz allenfalls identifiziert werden könnte, so muss sofort die grosse Aehnlichkeit zwischen diesem Dextrin des Harns und dem von Landwehr beschriebenen sg. «thierischen Gummi» auffallen. Eine absolut sichere Identificirung beider Körper ist freilich vorderhand nicht möglich, denn dazu fehlt es an der Kenntniss spezifischer Charakteristika jenes «thierischen Gummis». Was Landwehr¹⁾ als Kennzeichen seines Körpers angibt, die Unlöslichkeit in Alkohol und die Bildung eines flockigen, sich beim Kochen nicht schwärzenden blauen Niederschlages mit Kupfersulfat wurde auch bei diesem Harndextrin beobachtet. Bei der geringen Menge derselben verboten sich aber weitere Untersuchungen von selbst und es muss daher in das Belieben eines jeden Einzelnen gestellt werden, ob er die von Wedenski und mir beschriebene Substanz Harndextrin oder thierisches Gummi benennen will.

Was bis jetzt an Eigenschaften dieser dextrinartigen Substanz sich ermitteln liess, ist Folgendes:

1. Sie wurde bis jetzt noch nicht völlig frei von Verunreinigungen mit Salzen, besonders Phosphaten, gewonnen.
2. Sie wird aus ihrer wässerigen Lösung durch Alkohol gefällt und bildet beim Erwärmen einen flockigen Niederschlag.
3. Diese Abscheidung ist keine vollständige.
4. Sie gibt noch in erheblicher Verdünnung deutliche Furfurol-Reaction.
5. Sie reducirt die Fehling'sche Lösung nicht.

¹⁾ Centralbl. f. die med. Wissensch. 1885, Nr. 21.

6. Sie gibt mit Kupfersulfat und Natronlauge einen blauen, flockigen, beim Kochen sich nicht schwärzenden Niederschlag.
7. Sie lässt sich durch verdünnte Schwefelsäure in eine die alkalische Kupferlösung reducirende Substanz überführen.
8. Diese Verzuckerung erfolgt relativ langsam.
9. Sie gibt keine Glykogen- und keine Eiweisreactionen.
10. Sie gibt mit Benzoylchlorid und Natronlauge einen in Wasser unlöslichen Niederschlag.

Ich habe es nicht unterlassen, über das Vorhandensein dieses Körpers in jedem normalen Harn und seine Mengenverhältnisse noch auf anderem Wege mir Aufschluss zu verschaffen.

Sowohl eingedampfter als frischer Harn wurde jeweils mit dem mindestens vierfachen Volumen absoluten Alkohols versetzt, dann auf dem Wasserbad bis zur flockigen Ausscheidung des Niederschlags erwärmt und nach dem Erkalten abfiltrirt. Der mit Alkohol ausgewaschene Niederschlag wird in wenig Wasser gelöst und die von den nichtgelösten Salzen abfiltrirte Lösung in der Weise benzoylirt, dass auf 1 l Harn 40 ccm. Benzoylchlorid und die zehnfache Menge Natronlauge verwendet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass man den Esterniederschlag nicht lange mit der Natronlauge stehen lassen darf, da sich der Benzoësäureester des Dextrins mit Natronlauge relativ rasch verseift.

Besonders bei Verarbeitung nichteingedampften Harns habe ich rasch und sofort klar filtrirende Mischungen erhalten.

Es wurde nun an Ester gefunden für 1000 ccm. Harn:

aus eingedampftem:	nicht eingedampftem Harn:
1. 0,086 gr.	7. 0,063 gr.
2. 0,102 »	8. 0,080 »
3. 0,041 »	—
4. 0,120 »	—
5. 0,125 »	—
6. 0,062 »	—

Im Mittel kommen also auf 100 ccm. Harn bei Verwendung eingedampften Harns 0,008, bei frischem Harn 0,007 gr.; bei ersterem schwankt die Menge zwischen 0,004 und 0,012 gr., also um das Dreifache.

Der getrocknete Niederschlag dieses Esters gibt Furfurolreaction, doch ist im Spektroskop das Roth durch eine braune Nebenfärbung etwas verdeckt und undeutlich, tritt aber beim Erhitzen im kochenden Wasserbad deutlicher hervor.

Eine Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung konnte nicht ausgeführt werden, da der Körper sich als aschehaltig erwies. Die Salze bestanden im Wesentlichen aus Phosphaten.

Aus den angeführten Bestimmungen lassen sich bestimmte Schlüsse auf die Mengen, in welchen die Substanz im Harn erscheint, natürlich nicht machen. Denn einerseits ist der Niederschlag aschehaltig, auf der anderen Seite ist zu bedenken, dass durch Alkohol dieses Harndextrin aus wässerigen Lösungen bezw. aus dem Harn niemals vollständig abgeschieden werden kann.

Für quantitative Bestimmungen erweist sich keiner der im Vorhergehenden beschriebenen Wege der Isolirung des Körpers als brauchbar. Wer sich von dem Vorhandensein des Dextrins im normalen Harn überzeugen will, wird am besten der Wedenski'schen Methode sich bedienen. Es empfiehlt sich hierbei nur, die durch Verseifung mit Natronlauge gewonnene Lösung vor dem Fällern mit Alkohol mit starker Essigsäure anzusäuern.

III. Die neben Traubenzucker und dextrinartiger Substanz im Benzoyl ester des Harns enthaltenen Kohlehydrate.

Da wie oben gezeigt worden ist, eine durch Verseifung von reinem Traubenzuckerbenzoyl ester gewonnene Zuckerlösung vollständig mit Hefe vergährt, so zwar, dass in der vergohrenen Lösung durch keine der bekannten Zuckerreactionen mehr ein Kohlehydrat nachgewiesen werden kann, so erhellt aus den zuletzt besprochenen Gährungsversuchen unzweideutig, dass neben dem Traubenzucker im normalen Harn noch ein Kohlehydrat enthalten sein muss, welches sich von diesem

vor Allem durch den Mangel des Gährungsvermögens unterscheidet.

Um näheren Aufschluss über diesen Körper zu gewinnen, wurden mehrere Portionen des Benzoylniederschlags aus dem Harn verseift, wobei die gewonnene traubenzuckerhaltige Flüssigkeit, welche in diesen Fällen nicht mit Bleiacetat behandelt worden war, mit frischer Hefe zur Vergärung gebracht wurde. Nach Beendigung der Gärung wurde filtrirt, das Filtrat zuerst mit neutralem, dann mit basischem Blei gefällt, wobei sich jedesmal ein Niederschlag bildete. Das Filtrat wurde entbleit, die klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit reducirte Kupfersulfat. Einmal wurde mit einer solchen Lösung eine schwache Rechtsdrehung constatirt. Mit Phenylhydrazin wurde ein gut kristallisirendes Osazon erhalten, dessen mikroskopisches Bild grosse Aehnlichkeit mit dem Glukosazon der Dextrose darbot; sich aber von demselben durch den niedriger liegenden Schmelzpunkt: 175° — 180° unterschied. Ausserdem gab die Flüssigkeit stets eine intensive Furfurolreaction, die in einem Falle bei Verarbeitung von 20 gr. Harnester in 30 ccm. dem Furfurolwerth einer 1 proc. Traubenzuckerlösung entsprach. Eine vergohrene reine Traubenzuckerlösung zeigte nur eine schwache Andeutung von Furfurolreaction. Auch gab die Lösung dieses Kohlehydrats mit Natronlauge und Benzoylchlorid einen in Wasser unlöslichen Niederschlag.

Welchem der bekannten Kohlehydrate dieser im Harnbenzoylester enthaltene Körper entspricht, muss zunächst noch dahingestellt bleiben. Von den durch Salkowski¹⁾ im Harn gefundenen Pentosen unterscheidet er sich durch den höher liegenden Schmelzpunkt seines Osazons: der des Osazons der Pentose liegt bei 159° .

Bei mehreren der früher geschilderten Versuche wurde erwähnt, dass die mehr oder weniger gefärbten Flüssigkeiten durch Behandlung mit neutralem oder basischem Bleiacetat entfärbt und gereinigt wurden. Es war von Interesse, festzu-

¹⁾ Centralblatt f. d. medic. Wissensch. 1892, Nr. 19 und 32.

stellen, ob diese Bleiniederschläge, welche in den von dem Harndextrin befreiten Lösungen erhalten wurden, Zucker oder zuckerartige Körper enthielten. Für eine derartige Feststellung ist vor allen andern Reactionen bei Ausschluss von Eiweiss-substanzen die Furfurolreaction zu verwerthen. Als die Bleiniederschläge durch Schwefelwasserstoff zerlegt wurden, ergab die vom Schwefelblei abfiltrirte Flüssigkeit nur eine schwache Furfurolreaction. Wurde diese Lösung von neuem mit Bleiacetat gefällt und der Niederschlag wie oben zerlegt und mit α -Naphthol und Schwefelsäure geprüft, so trat keine Furfurolreaction mehr ein, ein Beweis, dass in der Bleifällung Kohlehydrate nicht enthalten waren. Ausser sog. Extraktivstoffen enthält die Bleifällung stets merkliche Mengen von Phosphorsäure.

Es dürfte hier der Ort sein, auf die Untersuchungen Luther's¹⁾ über das Vorkommen von Kohlehydraten im normalen Harn einzugehen. Er benützte zu diesen Untersuchungen die Furfurolreaction in der Weise, wie sie von v. Udránszki als quantitative Methode ausgebildet worden ist. Damit combinirte er die Gährung des Harns mit Hefe so zwar, dass er zunächst im frischen Harn mit α -Naphthol und Schwefelsäure die Menge der vorhandenen Furfurol liefernden Substanzen bestimmte, alsdann den Harn mit Hefe vergähren liess und wieder quantitative Furfurolreaction anstellte. Das Plus an Furfurol liefernder Substanz des frischen Harns gegenüber dem vergohrenen bezog Luther auf Traubenzucker, den grössten Theil des nicht gährungsfähigen Restes auf thierisches Gummi. Nach dem damaligen Stand unserer Kenntnisse war diese Auffassung Luther's nicht ganz ohne Berechtigung. Nach Luther verhält sich die Gesamtkohlehydratausscheidung zu der Ausscheidung von thierischem Gummi wie 23:13²⁾. Die Gesamtkohlehydrate zerfallen demnach zu annähernd gleichen Theilen in Traubenzucker und thierisches Gummi.

Nachdem jetzt erwiesen ist, dass ausser dem gährungsfähigen Traubenzucker und dem Harndextrin im normalen

¹⁾ Luther, über das Vorkommen von Kohlehydraten im norm. Harn, I.-D., Berlin 1890.

²⁾ Luther, S. 43.

Harn noch mindestens eine Furfurol liefernde Substanz vorhanden ist, so darf jener nach dem Gähren des Harns übrigbleibende Rest nicht allein auf die dextrinartige Substanz bezogen werden. Ihre Menge ist daher geringer anzuschlagen als dies Luther gethan hat. Ich möchte nicht unerwähnt lassen, dass bei der Untersuchung von Lösungen, die nur geringe Mengen von Kohlehydraten enthalten, sich mir, wie Luther und v. Udránszki, die Furfurolreaction als überaus zweckdienlich erwiesen hat. Sie ermöglicht es, ohne dass man dabei von der Lösung etwas Nennenswerthes verliert, rasch eine annähernd quantitative Ermittlung des Kohlehydratgehalts anzustellen und Aenderungen desselben zu bestimmen.

Während wir nun dazu gelangt sind, einige der im Harnbenzoyl ester enthaltenen Körper auf Grund ihrer Reactionen unter die bereits bekannten Kohlehydrate einzureihen, darf nicht verschwiegen werden, dass es bis jetzt nicht gelungen ist, den von allen Untersuchern der Benzoylverbindungen des Harns constatirten Stickstoffgehalt desselben zu erklären. Salkowski bezog ihn auf Eiweisssubstanzen, J. W. L. Thudichum auf das Urochrom. Eine Nachprüfung¹⁾ auf erstere Substanzen hat nur ein negatives Resultat ergeben, das «Urochrom» dagegen war mir nicht zugänglich.

Von einer Verunreinigung im gewöhnlichen Sinn, von Beimischung einer anorganischen Substanz oder von Benzamid kann ebenfalls keine Rede sein. Dies geht aus folgender Thatsache hervor.

Eine durch Verseifung mit Natriumäthylat aus 28 gr. Benzoyl ester des Harns gewonnene, zum Syrup eingedampfte Lösung wurde in wenig absolutem Alkohol gelöst und mit wasserfreiem Aether versetzt. Dabei entstand eine weissliche Trübung, aus der sich eine amorphe halbflüssige Masse abschied. Nach einiger Zeit wurde die Flüssigkeit abgegossen, der amorphe Niederschlag in wenig Wasser gelöst. Die Lösung gab Furfurolreaction, drehte schwach rechts und reducirte alkalische Kupferlösung. Sie wurde über Schwefel-

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 18, S. 204.

säure zur Trockne verdunstet, das Gewicht betrug 0,788 gr. Bei der Benzoylirung in alkalischer Lösung entstand eine reichliche Abscheidung von Benzoylverbindungen, welche zuerst weich sind, nach dem Trocknen über Schwefelsäure erhärten und unter Gasentwicklung bei 120° schmelzen. Eine Stickstoffbestimmung ergab 2,0% N.

Im Uebrigen konnte auch auf diesem Wege ein näherer Aufschluss über den stickstoffhaltigen Körper nicht gewonnen werden. Nach den bisherigen Ermittlungen ist es nicht unwahrscheinlich, dass der Stickstoffgehalt einem Körper angehört, welcher ausserdem Kohlehydratreactionen zeigt.

Einen gewissen Anhaltspunkt für die Classificirung des stickstoffhaltigen Bestandtheils des Harn-Benzoylestern scheinen übrigens die Untersuchungen Schmiedeberg's¹⁾ über die interessanten Körper an die Hand zu geben, welche sich aus Knorpelgewebe darstellen lassen und zum Glykosamin in Beziehung stehen, amidartige Verbindungen, welche Derivate von Zuckerarten sind. Es ist nicht undenkbar und muss jedenfalls in Erwägung gezogen werden, dass unser stickstoffhaltiger, benzoylirbarer Körper in näherer Beziehung zu jenen Substanzen steht, die Schmiedeberg kennen gelehrt hat. Dafür spricht die Furfurolreaction, der Stickstoffgehalt, die Reduction der alkalischen Kupferlösung, die Rechtsdrehung, sowie die Leichtigkeit, mit welcher der Stickstoff beim Erhitzen mit Alkalien in Form von Ammoniak abgespalten wird.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Baumann, spreche ich für die überaus lebenswürdige Unterstützung, die er mir bei Ausführung vorliegender Arbeit jederzeit mit Rath und That hat angedeihen lassen, meinen tiefgefühlten Dank aus.

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. 28, S. 354-404.