

# Ueber das Vorkommen von Milchzucker im Harn bei Wöchnerinnen.

Von

**F. A. Lemaire.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium in Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 29. December 1895.)

Bekanntlich wird die reducirende Kraft des Harns bei Wöchnerinnen öfters ein wenig erhöht gefunden. Seitdem Hofmeister aus solchem Harn Milchzucker in Substanz abgeschieden hat<sup>1)</sup>, ist man vielfach geneigt, diese Verstärkung des Reductionsvermögens ohne Weiteres der Anwesenheit von Milchzucker zuzuschreiben. So schliesst Ney, der bei 148 Wöchnerinnen den Harn untersuchte, und in  $\frac{1}{5}$  Fällen Zucker nachweisen zu können glaubte<sup>2)</sup>, seine Abhandlung mit der Bemerkung: «Der Nachweis, dass es sich um Milchzucker und nicht um Traubenzucker hier handelt, ist von Hofmeister in so überzeugender Weise geleistet worden, dass ich diese Untersuchungen bei Seite liess». Diese Bemerkung ist um so auffallender, als Ney für den Nachweis von Zucker die Trommer'sche und Böttger'sche Proben und die Gährungs-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. I, S. 101.

<sup>2)</sup> Archiv f. Gynäkol., Bd. XXXV, S. 239.

probe gebrauchte; auch die letztgenannte Probe lieferte ihm in manchen Fällen ein positives Resultat. Milchzucker wird aber nicht oder äusserst schwer von gewöhnlicher Hefe angegriffen. Und da Ney nur von «Gährung» und «die Gährungsprobe» spricht, ohne nähere Erklärung, muss man wohl annehmen, dass er in seinen Versuchen gewöhnliche Bierhefe gebraucht hat.

Obgleich man, nach den von Hofmeister erhaltenen Resultaten, sicher annehmen darf, dass im Harn von Wöchnerinnen Milchzucker vorkommen kann, und obgleich man es als einigermaassen wahrscheinlich betrachten darf, dass in jenen Fällen, wo der Harn von Frauen post partum eine vorübergehende Erhöhung des Reduktionsvermögens zeigte, nicht mit Unrecht von Lactosurie gesprochen wurde, ist dennoch den bisher gelieferten Angaben in Bezug auf die Häufigkeit der Lactosurie bei Wöchnerinnen nicht sehr viel Gewicht beizulegen.

Die am meisten gebrauchte Trommer'sche Probe gibt keinen sicheren Aufschluss. Jeder normale Menschenharn reducirt Kupferhydroxyd in alkalischer Lösung, und die Grösse der Reduction hängt nicht nur von der Zuckermenge ab, welche der Harn enthält. Das Kreatinin hindert ausserdem die Fällung des Kupferoxyduls, sodass es schwer wird, über die Intensität der Reduction zu urtheilen. Auch ein positives Resultat mit der Böttger'schen Probe lässt nicht mit Sicherheit auf das Vorhandensein von Zucker im Harn schliessen, rechtfertigt aber viel weniger die Annahme, der Harn enthalte Milchzucker.

Ich hielt es für der Mühe werth, die neueren Forschungsmethoden in Bezug auf diese Frage anzuwenden.

Baumann hat im Benzoylchlorid ein vorzügliches Mittel kennen gelehrt zur Fällung der Kohlehydrate als in Wasser unlöslichen Verbindungen, auch wo dieselben in so verdünnter Lösung vorhanden sind, wie es im normalen Harn der Fall ist, und E. Fischer hat gelehrt, verschiedene Zuckerarten, mittelst Phenylhydrazin, in gut unter einander zu unterscheidenden Verbindungen festzulegen. Nachdem von Bau-

mann und seinen Schülern untersucht war, in welcher Weise die Kohlehydrate am besten mittelst Benzoylchlorid aus dem Harn auszuschneiden und dann wieder aus der Verbindung zu lösen sind, hat Baisch beide Methoden combinirt, und so die so lange Zeit umstrittene Frage, ob normaler Menschenharn Glucose enthält, mit vollkommener Sicherheit im positiven Sinne beantworten können. Weiter fand er, neben der Glucose, in geringerer Menge eine reducirende, rechtsdrehende, aber nicht gährungsfähige Substanz, welche sich bei näherer Prüfung mit grosser Wahrscheinlichkeit als Isomaltose herausstellte, und ein dextrinartiges Kohlehydrat, welches schon früher von Wedenski aufgefunden war, und wahrscheinlich als identisch mit der von Landwehr unter dem Namen «thierisches Gummi» beschriebenen Substanz betrachtet werden muss<sup>1)</sup>.

Es war zu erwarten, dass es, mit Hülfe der von Baisch angewendeten Methoden, auch möglich sein würde, festzustellen, ob im Harn von Wöchnerinnen Milchzucker, sei es auch in sehr kleiner Menge, vorkommt.

Bevor ich zur Untersuchung des Harns von Wöchnerinnen übergang, habe ich erst, in der von Baisch beschriebenen Weise, die Kohlehydrate aus normalem Menschenharn bereitet, und dabei die von diesem Forscher erhaltenen Resultate vollkommen bestätigen können.

Nachdem der Harn mit wenig Natronlauge alkalisch gemacht und filtrirt war, wurden auf je 100 ccm. Filtrat 40 ccm. 12procentiger Natronlauge und 5 ccm. Benzoylchlorid zugesetzt. Das Gemisch wurde etwa eine Stunde lang geschüttelt. Während des Schüttelns wurde die Flasche dann und wann mit kaltem Wasser abgekühlt. Der Geruch nach Benzoylchlorid war dann beinahe verschwunden; völlig zu entfernen war derselbe nicht, auch nicht, wenn das Gemisch 4 bis 5 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt wurde. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, auf dem Filter mit Wasser bis zur neutralen Reaction gewaschen und dann über Schwefel-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVIII. S. 193, Bd. XIX. S. 339, Bd. XX, S. 249.

säure getrocknet. Aus 100 ccm. Harn wurde im Mittel 0,254 gr. trockener Ester erhalten.

Die von Salkowski<sup>1)</sup> hervorgehobene Schwierigkeit, dass die Filtration sehr langsam von Statten geht, und dass es nicht möglich sei, den getrockneten Niederschlag gut vom Filter zu lösen, wurde in meinen Versuchen nicht beobachtet, wenn wenigstens das Gemisch lange genug geschüttelt war. Baisch gibt den Rath, den Niederschlag, nach dem Filtriren und Auswaschen, mit verdünnter Salzsäure zusammenzureiben und dann wieder bis zum Verschwinden der Chlorreaction auszuwaschen. Auf diese Weise sei das Präparat, nach Baisch, asche- aber nicht stickstofffrei zu erhalten. In meinen Versuchen wurde aber der Ester durch Behandlung mit Salzsäure klebrig und dadurch schwierig vom Filter zu lösen. Ich habe deshalb das Auswaschen mit Salzsäure fortgelassen, zumal der Aschegehalt des Esters in meinen Versuchen nicht schadete.

Der trockene Ester wurde, nach der Vorschrift von Baisch, mit Natriumäthylat verseift. Nur wurde dabei die Flüssigkeit mit fliessendem Wasser aus der Wasserleitung, nicht so stark also wie in Baisch's Versuchen, abgekühlt. Dann wurde die Lösung, ganz in der von Baisch angegebenen Weise, mit Schwefelsäure, Aether und Alkohol behandelt. Schliesslich erhielt ich eine bräunlich gefärbte Flüssigkeit, welche in allen Fällen, mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat, ein sich bei Siedehitze ausscheidendes, aus grossen, in Pfeilbündeln oder Kornähren ähnlichen Figuren gruppirten Krystallnadeln bestehendes Osazon lieferte, dessen Schmelzpunkt nach Reinigung der Substanz mittelst wiederholter Lösung in Alkohol und Fällung mit Wasser bei 203 bis 204° C. gefunden wurde, und deshalb als Phenylglucosazon zu betrachten war.

Wie Baisch fand ich, dass die nach der Verseifung des Esters erhaltene Lösung ihr Reductionsvermögen nicht ganz verliert, wenn die Glucose daraus mittelst Hefe entfernt wird.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XVII. S. 245.

Behufs Untersuchung der nicht von der Gährung zerstörten Substanz wurden jedesmal beträchtliche Mengen trockenen Benzoylestern (30—40 gr.) mit Natriumäthylat verseift. Die daraus erhaltene Lösung der Kohlehydrate in Wasser wurde mit Hefe versetzt, nachdem der Flüssigkeit, damit die Hefezellen stickstoffhaltige Nahrung in genügender Menge finden sollten, ein wenig Witte'sches Pepton (welches bei Behandlung mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat keinen krystallinischen Niederschlag lieferte) zugesetzt. Nachdem die Gährung 48 Stunden gedauert hatte, wurde die Flüssigkeit mit einer reichlichen Menge Alkohol vermischt, damit Hefe und Pepton mittelst Filtration entfernt werden konnten. Der Alkohol wurde durch Eindampfen aus dem Filtrat verjagt. Jetzt stellte es sich heraus, dass die Lösung nicht nur im Stande war, Fehling'sche und Nylander'sche Flüssigkeit zu reduciren, sondern auch die Polarisationsebene nach rechts drehte.

Bei der Behandlung mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat blieb jetzt die Flüssigkeit, so lange sie heiss war, vollkommen klar. Erst beim Abkühlen bildete sich ein Niederschlag von feinen, gelben, in Rosetten gruppirten Krystallnadeln, viel feiner wie die Krystalle des Phenylglucosazons. Das Klarbleiben der Flüssigkeit bei der Kochhitze zeigte auch deutlich genug, dass die Glucose thatsächlich von der Hefe verbraucht war. Der Schmelzpunkt der Krystalle wurde bei 150—151° C. gefunden. Dieses Kohlehydrat verhielt sich, so weit ersichtlich, in jeder Hinsicht, wie Baisch bemerkt hat, wie die von Fischer, Lintner und Anderen beschriebene Isomaltose. Indessen zeigt es auch Aehnlichkeit mit einem von Salkowski in drei Fällen aus Menschenharn isolirten Kohlehydrat, und zwar einer Pentose<sup>1)</sup>. In jedem dieser drei Fälle handelte es sich um Harn, welcher, mit Kupfersulfat und Natronlauge erhitzt, deutliche Ausscheidung von Kupferoxydul veranlasste und optisch inactiv oder sehr schwach rechtsdrehend war. Das Reductionsvermögen dieses

<sup>1)</sup> Centralbl. f. d. Med. Wissensch., 1892, S. 337 und 593. Berl. klin. Wochenschr., 1895, No. 17.

Harns wurde verursacht durch das Vorhandensein einer Pentose, welche mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat ein Osazon liefern, welches, wie das unsrige, in heissem Wasser löslich war und sich beim Abkühlen in feinen, in Rosetten gruppirten Nadeln ausschied. Der Schmelzpunkt dieser Krystalle wurde bei  $157^{\circ}$ — $159^{\circ}$  C. gefunden.

Es wäre gar nicht undenkbar, dass diese Pentose auch in normalem Harn vorkäme, sei es von der Pentosen enthaltenden Pflanzennahrung, sei es vom Organismus selber herrührend. Hammarsten erhielt ja aus einem Nucleoproteid des Pancreas, durch Spaltung mittelst Schwefelsäure, eine Substanz, welche er mit grosser Wahrscheinlichkeit als eine Pentose betrachten zu dürfen glaubte<sup>1)</sup>, und welche von Salkowski für identisch mit der von ihm aus Harn bereiteten Pentose gehalten wird. Der Schmelzpunkt des Osazons des von Baisch und mir aus normalem Harn bereiteten Zuckers sprach aber gegen die Identificirung desselben mit der Salkowski'schen Pentose. Baisch fand zwar in seinen ersten Versuchen den Schmelzpunkt bei  $175$ — $180^{\circ}$  C., später aber, als er die Substanz besser gereinigt hatte, schmolz sie bei  $152$ — $154^{\circ}$ . Ich habe in verschiedenen Versuchen, in welchen das Osazon jedesmal durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser gereinigt war, den Schmelzpunkt nicht unter  $150^{\circ}$  und nicht höher wie  $151^{\circ}$  C. gefunden.

Der Unterschied mit dem von Salkowski gefundenen Schmelzpunkt ist zu gross, als dass man die zwei Substanzen für identisch halten könnte. Dazu kommt, dass Salkowski zwar in seiner ersten Mittheilung von einer geringen Rechtsdrehung der Pentose enthaltenden Harne spricht, in seiner neuerdings erschienenen Arbeit darüber aber nichts mehr sagt als: «Gährungsprobe<sup>2)</sup> und Polarisation fallen negativ aus<sup>3)</sup>». Ich habe dagegen mit Sicherheit feststellen können, dass die

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, S. 26.

<sup>2)</sup> Külz und Vogel fanden übrigens, dass die von ihnen untersuchte, in Diabetesharn vorkommende Pentose von gewöhnlicher Hefe vollkommen verbraucht wurde. Zeitschr. f. Biol., Bd. XXXII, S. 188.

<sup>3)</sup> Berl. klin. Wochenschr., 1895, S. 366.

aus normalem Harn bereitete Lösung, auch nachdem sie durch die Gährung vollkommen von Glucose befreit war, die Polarisationsebene nach rechts drehte.

In der Absicht, mit mehr Sicherheit beurtheilen zu können, ob der von Baisch und mir untersuchte Zucker zu den Pentosen gerechnet werden muss, habe ich den Stickstoffgehalt des Osazons bestimmt. Die Zusammensetzung von Pentosazon ist  $C_{17}H_{30}N_4O_8$ , diejenige von Isomaltosazon ist  $C_{24}H_{32}N_4O_9$ . War die Substanz eine Pentose, so müsste also der Stickstoffgehalt des Osazons 17,07% betragen, während für Isomaltose ein Stickstoffgehalt von 10,77% erwartet werden musste.

Zwei Mal habe ich, nach der Kjeldahl'schen Methode, den Stickstoffgehalt des durch Umkrystallisiren gereinigten Osazons bestimmt. Das eine Mal wurde aus 0,400 gr. bei  $110^\circ C$ . getrockneter Substanz 0,0416 gr. Stickstoff erhalten, entsprechend einem N-Gehalt von 10,4%. Das zweite Mal lieferte 0,300 gr. trockene Substanz 0,0315 gr. Stickstoff, was einem N-Gehalt von 10,5% entspricht.

Hierdurch ist, wie ich glaube, jeder Zweifel gehoben. Der aus normalem Menschenharn erhaltene, nicht gährungsfähige Zucker ist nicht eine Pentose, sondern stimmt in Eigenschaften und Zusammensetzung mit Isomaltose überein.

Neuerdings ist aber die Frage aufgeworfen, ob man das Recht hat, die mittelst Diastase aus Stärke erhaltene Isomaltose als eine Substanz sui generis zu betrachten. Brown und Morris berichteten<sup>1)</sup>, dass es ihnen gelungen war, nachzuweisen, dass die nach Lintner aus Stärke bereitete Isomaltose verunreinigte Maltose ist. Mittelst fractionirter Alkoholfällung, und auch durch Einwirkung von Hefe, konnten sie aus Isomaltose eine Substanz bereiten, deren Osazon, in Bezug auf Schmelzpunkt und Krystallform, ganz mit dem Maltosazon übereinstimmte. Ausserdem konnten sie Maltose in der Krystallform des Isomaltosazons zur Ausscheidung bringen, indem sie in die Mutterlauge, aus welcher das Iso-

<sup>1)</sup> Journ. of the Chem. Soc. Vol. LXVII and LXVIII, p. 709.

maltosazon herauskrystallisirt war, reine Maltose lösten, und diese wieder mit Phenylhydrazin behandelten. Sie kommen zu dem Schluss, dass «Lintner's isomaltose is a mixture of maltose and dextrinous compounds of the maltodextrin or amyloïn class», und dass «the crystallisable osazone which Lintner has described as «isomaltosazone» and upon which he has mainly founded his belief in the existence of «isomaltose» is nothing but maltose modified in its crystalline habit and melting point by the presence of small but varying quantities of another substance. — The substance or substances which are capable of thus modifying maltosazone are the products of the reaction of phenylhydrazine on the dextrinous compounds».

Nachdem nun von Külz und Vogel auch bei der Einwirkung von Speichel und Pancreassaft auf Amylum und Glycogen Isomaltose als Digestionsproduct gefunden wurde, neben Maltose und Dextrose<sup>1)</sup>, kann man daran denken, ob die von Brown und Morris geübte Kritik vielleicht auch für diese Untersuchungen Geltung hat.

Deshalb hatte ich mir jetzt auch die Frage vorzulegen: ist vielleicht die in normalem Harn vorhandene Substanz, deren Osazon die Eigenschaften des Isomaltosazons zeigt, Maltose, welche bei der Behandlung mit Phenylhydrazin in unreinem Zustand und in Folge dessen in modificirter Krystallform und mit erniedrigtem Schmelzpunkt ausgeschieden wird?

Erstens habe ich also das aus Harn bereitete Product wiederholt umkrystallisirt. Weder die Krystallform noch der Schmelzpunkt erfuhr dabei irgend eine Veränderung, welche doch erwartet werden sollte, falls das Osazon mit anderen Stoffen verunreinigt war.

Weiter wurde reine Maltose in Wasser gelöst, mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat versetzt, und die Lösung in zwei gleiche Hälften getheilt. Der einen Hälfte wurde dann Dextrin, in weiter unten zu beschreibender Weise aus Harn bereitet, hinzugesetzt. Darauf wurden beide Flüssig-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol., Bd. XXXI, S. 108.

keiten eine Stunde lang im Wasserbade gekocht. Beim Abkühlen lieferten beide Flüssigkeiten einen krystallinischen Bodensatz, welcher in jeder Hinsicht die Eigenschaften des Maltosazons zeigte. Auch die aus der absichtlich mit Dextrin verunreinigten Lösung ausgeschiedenen Krystalle besaßen die Eigenthümlichkeiten des Maltosazons, dessen Krystalle durch Grösse und Gruppierung leicht von denjenigen des Isomaltosazons zu unterscheiden sind, und schmolzen erst bei  $206^{\circ}$  C., derselben Temperatur, bei welcher die aus der reinen Maltoselösung ausgeschiedenen Krystalle schmolzen.

Mit Rücksicht auf die Möglichkeit, dass vielleicht andere, aus dem Harn herstammende Stoffe als das Dextrin im Stande wären, die Eigenschaften des Maltosazons zu beeinflussen, wurde noch folgender Versuch angestellt. In der gewöhnlichen, oben beschriebenen Weise wurde Isomaltosazon aus Harn bereitet. Nach dem Abfiltriren der Krystalle wurde in der Mutterlauge reine Maltose gelöst. Diese Lösung wurde mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat gekocht. Beim Abkühlen setzten sich nur grosse, gelbe Nadeln ab, deren Schmelzpunkt bei  $206^{\circ}$  C. gelegen war. Krystalle also, welche die Eigenschaften des Maltosazons, nicht diejenige des Isomaltosazons zeigten.

Ich habe also nicht den geringsten Grund gefunden für die Annahme, dass das aus dem Harn nach Abscheidung der Glucose bereitete Osazon verunreinigtes Maltosazon sei. Die Substanz stimmt vielmehr in ihren Eigenschaften vollkommen überein mit dem Osazon der Isomaltose, welche zuerst von E. Fischer durch Einwirkung von rauchender Salzsäure auf Amylum bereitet worden ist, und später von verschiedenen Forschern als ein Product der Einwirkung von Enzymen auf Stärke und auf Glycogen gefunden wurde.

Ich glaube also berechtigt zu sein, zu sagen, dass in normalem Menschenharn neben Glucose Isomaltose vorhanden ist.

Die aus dem Harn ausgeschiedenen Benzoyl ester enthalten noch ein drittes dextrinähnliches Kohlehydrat.

Zur Bereitung dieser Substanz habe ich die von Baisch gebrauchte Methode ein wenig modificirt. Beim Einengen der durch Verseifung der Ester erhaltenen, neutralisirten, mit Alkohol vermischten und durch Filtration grösstentheils vom Natriumsulfat befreiten Flüssigkeit scheiden sich braune Flocken aus. Jetzt kann, durch Zusatz von Alkohol in Ueberschuss, Dextrin gefällt werden. Auf diese Weise erhält man aber ein ziemlich stark, namentlich mit anorganischen Stoffen verunreinigtes und nicht oder kaum davon zu befreiendes Präparat. Man braucht aber nach Verseifung des Esters mit Natriumäthylat das Dextrin nicht erst zu lösen und dann wieder mit Alkohol zu fällen. Wird der Ester, unter fortwährendem Umrühren und Abkühlen der Flüssigkeit, in Natriumäthylat gebracht, so sieht man die einigermaassen zähen Klümpchen des Esters allmählig verschwinden. Die Flüssigkeit wird aber nicht klar. Es bildet sich eine flockige Fällung, welche aus dem freif gewordenen Dextrin besteht. Dieser Niederschlag wurde, sobald die Verseifung beendet war, abfiltrirt.

Die sehr schnell filtrirende Flüssigkeit konnte dann mit Schwefelsäure versetzt und in der gewöhnlichen Weise zur Zuckerbereitung verarbeitet werden.

Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, durch Filtriren von unlöslichen Bestandtheilen getrennt, mit reichlichem Ueberschuss von Alkohol wieder gefällt, nochmals in Wasser aufgelöst und mit Alkohol gefällt, mit absolutem Alkohol und dann mit Aether gewaschen und getrocknet. So wurde ein vollkommen weisses, ein wenig hygroskopisches Pulver erhalten, welcher nur wenig anorganischen Stoff enthielt. Auf 0,1996 gr. bei 110° C. getrockneter Substanz fand ich 0,0025 gr. Asche. Weder mit Natronkalk, noch mit der so scharfen Lassaigne'schen Reaction war eine Spur Stickstoff darin nachzuweisen. Mit Natronlauge und Kupfersulfat gab sie eine flockige, blaue Fällung, welche sich beim Kochen nicht verfärbte. Erst nach ziemlich langem Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure lieferte sie eine Kupferhydroxyd in alkalischer Lösung reducirende Substanz. Die wässerige Lösung war vollkommen klar und gab keine Glycogenreaction mit Jod.

Leider konnte ich, wegen Mangel an Zeit, die weitere Untersuchung dieser Substanz nicht fortsetzen. Es ist, wie ich glaube, sicher, dass dieselbe auf dem von mir befolgten Wege in genügender Menge und genügend rein zur genaueren Erforschung ihrer Eigenschaften und Zusammensetzung zu bereiten ist.

Nachdem ich also durch eigene Erfahrung die Zweckmässigkeit der von Baisch gebrauchten Methode und die Richtigkeit seiner Resultate kennen gelernt hatte, konnte ich übergehen zu dem eigentlichen Zweck meiner Arbeit: eine Antwort zu suchen auf die Frage, ob bei Wöchnerinnen Milchzucker im Harn vorkommt.

Auch Milchzucker liefert in Wasser unlösliche Benzoyl-ester, und das mittelst Phenylhydrazin aus Lactose zu erhaltende Osazon lässt sich von anderen Osazonen, namentlich von denjenigen der in normalem Harn vorkommenden Zuckerarten, gut unterscheiden. Phenyllactosazon unterscheidet sich vom Phenylglucosazon sowohl wie vom Phenylisomaltosazon durch Löslichkeit, Krystallform und Schmelzpunkt und zwar folgender Weise:

	In heissem Wasser.	Krystallnadeln.	Schmelzpunkt.
Phenyllactosazon . .	Leichtlöslich	Fein, zu Kugeln vereinigt	200° C.
Phenylglucosazon . .	Schwerlöslich	Gross, » Büscheln »	204°—205° C.
Phenylisomaltosazon	Leichtlöslich	Fein, » Rosetten »	150°—153° C.

Man dürfte also erwarten, dass etwa im Harn vorhandener Milchzucker, auch wenn derselbe in nicht so grosser Menge darin vorkam, dass das Reductionsvermögen des Harns merkbar erhöht war, mit Hülfe der oben beschriebenen Methode mit Sicherheit zu finden sein würde.

Von 19 Frauen habe ich den Harn untersucht, kurz vor und kurz nach der Entbindung. Jedesmal wurde die in 24

Stunden ausgeschiedene Harnmenge in Untersuchung genommen. Ganz in der früher beschriebenen Weise wurde Benzoyl-ester aus dem Harn bereitet und mit Natriumäthylat verseift. Nachdem Benzoësäure, Natriumsulfat und Alkohol entfernt waren, wurde die Zuckerlösung mit Phenylhydrazin behandelt, eine Stunde lang im Wasserbade gekocht und heiss filtrirt. Die Phenylglucosazonkrystalle wurden auf dem Filter zurückgehalten, während die Osazone des Milchzuckers, falls derselbe vorhanden war, und der Isomaltose in das Filtrat übergingen und sich daraus erst beim Abkühlen ausschieden. In diesen Versuchen brauchte aber die Isomaltose kaum in Betracht genommen zu werden. Hier wurden ja nur etwa  $1\frac{1}{2}$  bis 2 Liter Harn zugleich verarbeitet, und die Menge der darin enthaltenen Isomaltose ist so gering, dass das beim Abkühlen des Filtrats sich ausscheidende Osazon dieser Substanz eine merkbare Trübung hervorzurufen nicht im Stande ist. Dass sie nicht gänzlich fehlt, geht daraus hervor, dass die nach Verseifung des Esters erhaltene Lösung, nach Entfernung der Glucose, und falls dieselbe vorhanden ist, der Lactose, noch ein wenn auch geringes Reductionsvermögen zeigt. In den oben beschriebenen Versuchen, wo es darauf ankam, das Isomaltosazon in solcher Menge zu bereiten, dass die Bestimmung des Schmelzpunktes und sogar des Stickstoffgehaltes möglich war, wurden viel grössere Mengen Harn zugleich in Arbeit genommen, wobei dann das durch Verseifung des Esters erhaltene Product auf ein kleines Volum gebracht wurde.

Ohne Ausnahme nun fand ich im Harn der Wöchnerinnen Milchzucker, während in dem vor der Entbindung untersuchten Harn derselben Frauen keine Spur dieser Substanz zu finden war. Wenn, nach dem Kochen mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat, die Flüssigkeit heiss filtrirt wurde, so schieden sich in allen Fällen, wo der Harn von einer Wöchnerin herrührte, beim Abkühlen aus dem Filtrat Krystalle aus, welche sich unter dem Mikroskop als aus feinen Nadeln bestehende Kügelchen erwiesen. Isomaltosazonkrystalle wurden dazwischen nicht beobachtet, obgleich ich annehmen muss, dass vereinzelte Krystalle dieser Art bei fleissigem Suchen zu

finden gewesen wären. Zur Reinigung wurden die Krystalle zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirt, und dann wurde der Schmelzpunkt bestimmt. Jedesmal wurde er bei  $199^{\circ}$  oder  $200^{\circ}$  C. gefunden. Sowohl in Bezug auf die Krystallform als auf den Schmelzpunkt stimmten also diese Krystalle mit denjenigen des Phenyllactosazons überein.

Die Krystalle, welche sich schon bei der Siedehitze ausgeschieden hatten, bestanden, wie zu erwarten war, aus Phenylglucosazon, wie aus der Krystallform und dem Schmelzpunkt hervorging. Zur Schmelzpunktbestimmung wurde die Substanz in Alkohol gelöst und mit Wasser wieder gefällt. Dann wurde die Flüssigkeit gekocht und heiss filtrirt. Diese Behandlung wurde dann noch einmal wiederholt, zur Beseitigung etwaiger Verunreinigung mit Lactosazon. Der Schmelzpunkt der getrockneten Krystalle wurde jedesmal bei  $203^{\circ}$  bis  $204^{\circ}$  C. gefunden.

Wie schon gesagt, wurde im Harn der Schwangeren in keinem der 19 untersuchten Fälle eine Spur von Milchzucker gefunden, selbst nicht in einem Fall, wo der Harn zwei Tage vor der Entbindung untersucht wurde, während bei der Frau schon Milchsecretion zu beobachten war.

Bei den Schwangeren wurde der Harn frühestens zwölf Tage, spätestens einen Tag vor der Entbindung untersucht, bei den Wöchnerinnen frühestens am ersten, spätestens am zwölften Tag nach der Geburt des Kindes.

In allen Fällen, sowohl vor wie nach dem Partus, wurde die Reaction des Harns sauer gefunden.

Der Harn der Schwangeren gab mit der Trommer'schen und mit der Nylander'schen Probe immer ein negatives Resultat. Bei der Untersuchung des Wöchnerinnenharnes wurde mit Nylander'scher Lösung in 13 von den 19 Fällen ein grauschwarzer Niederschlag erhalten, während die Trommer'sche Probe zweimal eine geringe Ausscheidung von Kupferoxydul lieferte.

Ogleich eine zuverlässige Bestimmung der im Harn vorhandenen Zuckermenge bei der von mir gedrauchten Me-

thode nicht möglich ist, da man nicht die Sicherheit hat, dass bei der Behandlung des Harns mit Benzoylchlorid aller Zucker als Benzoylester ausgeschieden wird und das beim Verseifen des Esters kein Zucker verloren geht, kam es mir doch vor, der Mühe werth zu sein, zu versuchen, den Zuckergehalt des Harns bei Frauen kurz vor und nach der Entbindung annähernd kennen zu lernen.

Zu diesem Zweck verfuhr ich in folgender Weise:

Erstens änderte ich die früher gebrauchte Methode in so weit, dass ich für die Ausscheidung des Esters mehr Benzoylchlorid und Natronlauge verwendete. G. v. Fodor fand nämlich<sup>1)</sup>, dass die Kohlehydrate des Harns am vollständigsten als Benzoylester gefällt werden, wenn zu dem 3 bis 4 Mal mit Wasser verdünnten Harn auf je 100 cbcm. (unverdünnten) Harn 10 cbcm. Benzoylchlorid und 80 bis 100 cbcm. 10 procentiger Natronlauge hinzugesetzt wurde. Zweitens habe ich jetzt, ebenso den Rath v. Fodor's befolgend, den Harn, sogleich nach dem Schütteln mit Benzoylchlorid, mit Salzsäure neutralisirt, in der Absicht, zu verhindern, dass der Ester in Folge lange dauernder Berührung mit Natronlauge wieder theilweise verseift wurde. Dann wurde der Ester abfiltrirt, ausgewaschen, getrocknet, gewogen, mittelst Natriumäthylat zersetzt u. s. w. ebenso wie früher. Die von Alkohol befreite Lösung der Kohlehydrate wurde bis auf 150 cbcm. eingeengt.

Ein Theil dieser Lösung wurde für die Behandlung mit Phenylhydrazin gebraucht. Ueber die so erhaltenen Resultate habe ich oben schon berichtet.

Ein anderer Theil wurde zur Bestimmung des Reductionsvermögens gebraucht. Ich machte diese Bestimmung mit Pavy's ammoniakalischer Kupferlösung, welche beim Kochen mit Zucker entfärbt wird, aber keinen Niederschlag von Kupferoxydul bildet<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Vide Baisch, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XIX, S. 339.

<sup>2)</sup> Pavy, The Physiology of the Carbohydrates, London, 1894, p. 71.

Diese Flüssigkeit hat nicht nur den Vortheil, dass mittelst derselben die Bestimmung des Reductionsvermögens schnell und bei einiger Uebung leicht ausführbar ist, sondern auch dass der Zweck mit einer kleineren Menge der Zuckerlösung erreicht wird, als beim Titriren mit Fehling'scher Lösung. Letztgenannter Vortheil hauptsächlich war für mich wichtig.

Aus der Bestimmung des Reductionsvermögens wurde der Zuckergehalt der Flüssigkeit berechnet, als ob aller darin enthaltene Zucker Glucose war. Das war unrichtig, denn der Harn der Schwangeren enthielt ausser Glucose immer noch ein wenig Isomaltose und der der Wöchnerinnen ausserdem noch Lactose. Diese Unrichtigkeit ist aber hier, wo es vor Allem auf Vergleichung ankommt, belanglos.

Ein anderer Theil der Lösung wurde mit gewöhnlicher Presshefe nach Zusatz von ein wenig Witte'schem Pepton, damit die Hefezellen keinen Mangel an stickstoffhaltiger Nahrung litten, 48 Stunden digerirt. Dann wurden Hefe und Pepton nach Zusatz von Alkohol in Ueberschuss durch Filtriren beseitigt, die Flüssigkeit auf dem Wasserbade von Alkohol befreit, zum ursprünglichen Volum eingeeengt und mit Pavy'scher Lösung titirt. Soviel jetzt weniger an Zucker gefunden wurde als bei der ersten Bestimmung, betrug der Glucosegehalt der Flüssigkeit.

Bei den aus Harn von Schwangeren erhaltenen Lösungen war nach der Gährung das Reductionsvermögen sehr geringfügig, dem Isomaltosegehalt entsprechend, bei denjenigen aus Wöchnerinnenharn dagegen war es noch beträchtlich, in Folge der Anwesenheit des Milchzuckers.

In der Absicht, einigermaassen über die Quantität des Milchzuckers ein Urtheil zu gewinnen, habe ich Saccharomyces-Kefyr in Verwendung gezogen. Professor Beyerinck in Delft hatte die Güte, mir eine Reincultur dieser Hefeart zu überlassen und mich über die Culturbedingungen derselben zu unterrichten.

Saccharomyces-Kefyr zersetzt sowohl Traubenzucker wie Milchzucker. Ich durfte also erwarten, dass das Reductionsvermögen der aus Wöchnerinnenharn bereiteten Lösung durch

die Einwirkung dieser Hefeart um so viel mehr verringert werden würde, als dem Milchzuckergehalt entsprach.

Die Kefyrhefe wurde auf einem folgenderweise bereiteten Nährboden gezüchtet.

Mit drei Volum Wasser verdünnter Milch wurde zur Fällung von Casein und Fett mit Schwefelsäure angesäuert und filtrirt. In 100 Theilen des Filtrats wurden 5 Th. Milchzucker und 2 Th. Witte'sches Pepton gelöst. Die Lösung wurde mit Natronlauge neutralisirt, mit 2 Th. Agar-Agar versetzt, im Koch'schen Dampfapparat gekocht, filtrirt, in sterilisirte Reagensröhren gebracht und abermals in strömendem Wasserdampf gekocht.

Die auf diesem Nährboden üppig gewachsene Hefe wurde von der Unterlage abgehoben und in genügender Menge mit einem Theil der aus dem verseiften Ester erhaltenen Zuckerlösung, welche wieder mit ein wenig Pepton versetzt war, vermischt. Nach 48 Stunden wurde die Flüssigkeit in derselben Weise als die mit gewöhnlicher Hefe behandelte von Hefezellen und Pepton befreit, auf das ursprüngliche Volum gebracht und mit Pavy'scher Lösung titrirt. In allen Fällen, wo Harn von Wöchnerinnen untersucht wurde, stellte es sich nun thatsächlich heraus, dass das Reductionsvermögen viel mehr abgenommen hatte, als nach der Behandlung mit gewöhnlicher Hefe. Die Differenz gab, als Glucose berechnet, den Milchzuckergehalt an. Was nach der Einwirkung der Kefyrhefe noch vom Reductionsvermögen übrig blieb, entsprach der in der Flüssigkeit vorhandenen Isomaltose.

Bisweilen habe ich auch einen Theil der aus dem Harn von Schwangeren bereiteten Flüssigkeit, in welcher mit Phenylhydrazin Lactose nicht nachzuweisen war, mit *Saccharomyces*-Kefyr behandelt. Die dadurch verursachte Verringerung des Reductionsvermögen war dann ebenso gross, wie die in einem anderen Theil derselben Flüssigkeit durch gewöhnliche Hefe veranlasste.

In der beschriebenen Weise habe ich von 15 Frauen, vor und nach ihrer Entbindung, den Harn untersucht. Die Resultate sind nachstehend tabellarisch zusammengestellt.

No.	Harnmenge in 24 Stunden.		Gewicht des Esters in Gramm.				Glucose in ‰		Lactose in ‰		Isomaltose in ‰		Bemerkungen.
	Ante Partum.	Post Partum.	Tag der Harnuntersuchung.		A. P.	P. P.	A. P.	P. P.	A. P.	P. P.	A. P.	P. P.	
			A. P.	P. P.									
I.	1,8 Liter	1,5 Liter	3 Tage	5 Tage	3,42	5,65	0,0065	0,009	0	0,013	0,0015	0,0030	A. P. Schwangerschaft normal Puerperium normal; reichliche Milchsecretion.
II.	2	1,9	2	7	3,2	8,20	0,0053	0,0065	»	0,023	0,0016	0,0021	Idem.
III.	1,5	1,8	3	8	2,25	9,50	0,0046	0,006	»	0,0415	0,0010	0,0018	Wenig Milch, Mammae schwach entwickelt.
IV.	1,7	2,1	2	6	3,45	10,20	0,0082	0,012	»	0,0351	0,0020	0,0024	Alles normal.
V.	2,2	1,5	2	9	5,12	8,30	0,009	0,014	»	0,0438	0,0015	0,0031	Mammae gut entwickelt. Fissurae papill. hindern regelmässiges Stillen.
VI.	2	1,7	8	5	4,50	6,50	0,008	0,0084	»	0,0210	0,0021	0,0033	Alles normal.
VII.	1,8	1,5	4	7	3,50	6,25	0,0061	0,009	»	0,0182	0,0016	0,0021	Mammae schwach entwickelt. Wenig Milch.
VIII.	2,1	1,3	1 Tag	8	3,99	5,61	0,009	0,0123	»	0,0256	0,0021	0,0035	Idem. Anämie.
IX.	2	1,75	5 Tage	10	4,15	8,32	0,0074	0,008	»	0,0380	0,0015	0,0021	Alles normal.
X.	1,6	1,2	9	7	2,45	4,56	0,0062	0,0095	»	0,0140	0,0012	0,0025	Reichliche Milchsecretion.
XI.	1,8	1,25	5	4	3,56	5,30	0,0073	0,0132	»	0,0256	0,0016	0,0023	Alles normal.
XII.	1,9	1,8	6	8	3,75	8,21	0,0038	0,0073	»	0,0370	0,0015	0,0031	Mammae schwach entwickelt. Wenig Milch.
XIII.	1,5	1,45	3	5	2,70	4,37	0,0048	0,0067	»	0,0165	0,0013	0,0026	Alles normal.
XIV.	1,6	1,26	7	10	3,23	5,90	0,006	0,0083	»	0,0236	0,0017	0,0025	Mammae schwach entwickelt. Wenig Milch.
XV.	1,7	1,5	4	3	2,95	6,10	0,0035	0,0092	»	0,0263	0,0013	0,0031	Alles normal.

Aus den Zahlen geht hervor, dass nach der Entbindung der Harn nicht nur in Folge der Ausscheidung von Milchzucker zuckerreicher wurde wie vor der Entbindung, sondern dass ausserdem der Gehalt an Glucose und Isomaltose, sei es auch wenig, in allen Fällen grösser gefunden wurde.

Zieht man das Mittel aus den in allen 15 Fällen gefundenen Zahlen, so findet man, dass der Gehalt des Harns an Glucose und Isomaltose (als Glucose berechnet) zusammen vor dem Partus 0,008% betrug, und nach der Entbindung 0,0118%. Auch wenn man in Betracht nimmt, dass die 24stündige Harnmenge nach der Entbindung mit zwei Ausnahmen (Fall III und IV) kleiner war als zuvor, so wurde, der Milchzucker ausser Acht gelassen, nach der Entbindung noch eine geringe Vermehrung der Zuckerausscheidung gefunden. Im Mittel betrug die 24stündige Harnmenge vor der Entbindung 1,8 Liter und nach der Geburt des Kindes 1,57 Liter. Vor der Entbindung wurden also in 24 Stunden an Glucose und Isomaltose zusammen im Mittel 0,144 gr. ausgeschieden, nach derselben 0,185 gr.

Ich brauche kaum zu sagen, dass ich diesen Zahlen keinen höheren Werth beizulegen wünsche, als sie beanspruchen.

Die Untersuchungsmethode ist nicht so, dass sie eine genaue quantitative Bestimmung zulässt. Dennoch stimmen die in den verschiedenen Versuchen gefundenen Werthe, wie ich glaube, unter sich genug überein, um den Eindruck zu erwecken, dass die bei der Bereitung der Ester und der nachfolgenden Behandlung erlittenen Verluste an Zucker nicht sehr wechselnd gewesen seien.

Soviel geht wenigstens mit Sicherheit aus meinen Befunden hervor, dass der Harn von allen 19 von mir untersuchten Wöchnerinnen Milchzucker enthielt, und dass dieser Stoff im Harn derselben Frauen in der allerletzten Periode der Gravidität nicht zu finden war.

Ich behaupte keineswegs, dass nicht auch vor der Entbindung, wenn die Milchsecretion in der letzten Periode der

Schwangerschaft schon anfängt, Milchzucker im Harn vorkommen kann, auch wenn ich nichts davon gefunden habe. Was aber bisher über Lactosurie bei schwangeren Frauen mitgeteilt ist, hat keine Beweiskraft, da die Diagnose dabei ausschliesslich mit Rücksicht auf das Reduktionsvermögen des Harns gestellt worden ist.

---