

Ueber den Nachweis gepaarter Glucuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn.

Von

P. Mayer und C. Neuberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1900.)

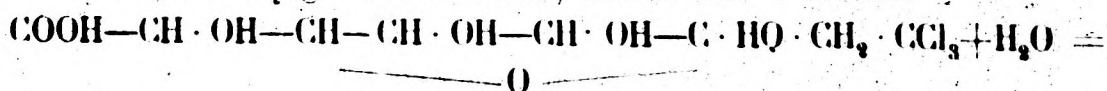
Der Nachweis der Glucuronsäure, dem man in jüngster Zeit auch ein klinisch-diagnostisches Interesse entgegenzubringen beginnt, ist bis vor Kurzem mit ausserordentlichen Schwierigkeiten verbunden gewesen.

Wenn es sich darum handelte, nach Zufuhr von Substanzen, die sich mit der Glucuronsäure paaren, die Anwesenheit der betreffenden gepaarten Glucuronsäuren im Harn zu erweisen, war man daher darauf angewiesen, diese Glucuronsäureverbindungen direkt aus dem Harn darzustellen, ein Verfahren, das in den meisten Fällen recht mühevoll ist und überhaupt nur dann gelingen kann, wenn sich grössere Mengen der betreffenden Substanz im Harne vorfinden. Ein italienischer Autor Vitali¹⁾ hat vor kurzem den Versuch gemacht, dieses Verfahren in einem speciellen Falle zu vereinfachen.

Der nach Chloralhydratgenuss Urochloralsäure enthaltende Harn wird zum Nachweis dieser Säure erst auf die Hälfte seines Volumens eingeeengt und dann mit Bleiacetat und Ammoniak ausgefällt. Der Niederschlag, in dem sich urochloralsaures Blei befindet, wird nach gehörigem Auswaschen mit Wasser durch Schwefelsäure zersetzt und das nunmehr freie Urochloralsäure enthaltende Filtrat mit Zinkpulver und

¹⁾ Dioscoride Vitali, Boll. Chim. Farm. 38, 377—380.

verdünnter Schwefelsäure am Rückflusskühler gekocht. Dabei wird die Urochloralsäure, entsprechend ihrer Zusammensetzung als Trichloraethylglucuronsäure, nach der Formel:



in Glucuronsäure und Trichloraethylalkohol gespalten, und gleichzeitig wird letzterer Alkohol zum gewöhnlichen Alkohol reducirt, den man nach dem Abdestilliren mittelst der üblichen Reactionen erkennen kann.

Wollte man auf dieses Verfahren, das auf einer Charakterisirung des Paarlings beruht, Methoden für den Nachweis der Glucuronsäure im Harn gründen, dann müsste zu diesem Zweck für jede einzelne der gepaarten Glucuronsäuren eine besondere Vorschrift ausgearbeitet werden, die in vielen Fällen schliesslich nicht einfacher sein kann, als die Darstellung der betreffenden gepaarten Glucuronsäure selbst.

Viel rationeller erscheint es, den allen gepaarten Glucuronsäuren gemeinsamen Paarling, die Glucuronsäure, nachzuweisen. Der eine¹⁾ von uns hat nun in einer früheren Arbeit bereits zum Nachweis der Glucuronsäure im Harn einen Weg angegeben, welcher darin besteht, den Harn behufs Spaltung der gepaarten Glucuronsäure mit verdünnter Schwefelsäure zu erhitzen. Dabei geht die anfängliche Linksdrehung allmählich in eine Rechtsdrehung über und der Harn gibt nach der Spaltung die Orcinsalzsäurereaction, welche in dem ungespaltenen Harn negativ ausfällt.

Diese einfache Methode wird zwar in den meisten Fällen für den klinischen Bedarf ausreichen, doch besitzt sie unzweifelhaft eine gewisse Unvollkommenheit und kann unter Umständen versagen.

Erstens liegt nämlich die Möglichkeit vor, dass der bei der Spaltung der stets linksdrehenden gepaarten Glucuronsäuren mit verdünnter Schwefelsäure abgetrennte Paarling auch optische Activität besitzt, Fälle, die bei den Campher-, Men-

1) P. Mayer, Berlin. klin. Wochenschr. 1899. Nr. 27 und 28.

thol- und Terpenglucuronsäuren, überhaupt nach Genuss zahlreicher activer Substanzen eintreten können. Da man nun über die Menge der gepaarten Glucuronsäuren in dem zu untersuchenden Harn fast niemals, über ihre Art auch nicht immer unterrichtet ist,¹⁾ befindet man sich in der Nothwendigkeit, die spaltende Wirkung der verdünnten Schwefelsäure eine Zeit andauern zu lassen, die man nur nach der Erfahrung bemessen kann, und deren Länge entsprechend der ungleich leichten Spaltbarkeit der gepaarten Glucuronsäuren eine recht verschiedene ist.

Dabei kann es nun vorkommen, dass einmal die Drehungsrichtungen von Glucuronsäure und Paarling entgegengesetzt sind und scheinbare Inactivität erzeugen, ferner kann es sich ereignen, dass beide Componenten die Ebene des polarisirten Lichts im gleichen Sinne ablenken und so durch eine gesteigerte Rechtsdrehung einen zu hohen Glucuronsäuregehalt vortäuschen.

Ausserdem tritt der störende Umstand hinzu, dass sich die Flüssigkeit bei der Spaltung mit Schwefelsäure in Folge der namentlich in unreinen Lösungen, wie Harn, recht erheblichen Empfindlichkeit der Glucuronsäure so dunkel färbt, dass eine Untersuchung am Polarisationsapparat unmöglich ist: mit Thierkohle findet zwar Entfärbung statt, aber ihre Anwendung ist nicht ratsam, da viel Glucuronsäure zurückgehalten und das Resultat dadurch bei geringer Concentration bis zur Unkenntlichkeit entstellt wird.

Was die Orcinsalzsäurereaction betrifft, so beweist zwar der positive Ausfall derselben nach der Spaltung mit Säure im Gegensatz zu dem negativen Ergebniss der Probe im ursprünglichen Harn stets das Vorhandensein von gepaarten Glucuronsäuren. Aber auch diese Probe kann unter Umständen im Stich lassen, da, wie aus den weiteren Versuchen des einen von uns²⁾ hervorgeht, bei sehr leicht spaltbaren gepaarten

¹⁾ Selbst aus einer ausgesprochenen Linksdrehung des nativen Harns kann man nicht auf die Menge der gepaarten Glucuronsäuren schliessen, da die specifische Drehung für nur wenige derselben ermittelt ist.

²⁾ P. Mayer, Berlin. klin. Wochenschr., 1900, Nr. 1.

Glucuronsäuren bisweilen schon vor dem Erhitzen des Harns mit Säure die Orcinreaction positiv ausfallen kann. Ueberdies ist die Orcinsalzsäurereaction von einer solchen Empfindlichkeit, dass die Stärke ihres Ausfalls keinen Schluss auf die wirklich vorhandenen Glucuronsäuremengen gestattet.

Bei dieser Sachlage war die Ueberführung der Glucuronsäure in ein charakteristisches, auch aus unreinen Lösungen erhältliches Produkt der einzige Weg, auf welchem man erfolgreich ihre Erkennung gründen konnte.

Von den bisher bekannten Verbindungen der Glucuronsäure könnte nur ihr basisches Baryumsalz für den erwähnten Zweck in Betracht kommen: aber seine Gewinnung fällt ziemlich mit der nicht leichten Reindarstellung der Glucuronsäure zusammen, ermöglicht ausserdem nur im Verein mit den anderen Eigenschaften der Glucuronsäure, optischer Activität, Reductionserscheinungen und Gährungsvermögen, ihren sicheren Nachweis.¹⁾

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, das Erkennungsmittel par excellence in der Reihe der Kohlehydrate; zu denen ja auch die Glucuronsäure als Carbonsäure einer Pentose zu zählen ist, das Phenylhydrazin, zur Abscheidung der Glucuronsäure in Anwendung zu bringen. Es hat sich aber gezeigt, dass unter verschiedenen Bedingungen, deren Einhaltung man nicht in der Hand hat, die einzelnen Autoren²⁾ zu ausserordentlich abweichenden³⁾ Resultaten gelangt sind. Diese kann man dahin zusammenfassen, dass je nach Anwendung von freier Säure, Lacton oder Salz mit ausserordentlich wechselnder Aus-

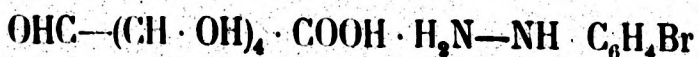
1) Siehe Huppert, Analyse des Harns, 1898, 10. Aufl., S. 204.

2) Thierfelder, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 11, S. 395. Geyer, Wiener Med. Presse, 1889, S. 1686. Hirschl, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 24, S. 579 u. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, S. 381. P. Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIX, S. 59. Tollens und Widtsoe, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 33, S. 142.

3) So hat Thierfelder bei Verwendung eines Alkalisalzes der Säure eine Phenylhydrazinverbindung erhalten, welche bei 114—115° schmilzt und eine complicirte Zusammensetzung zeigt. Ferner konnte vor Kurzem der Eine von uns (P. Mayer) feststellen, dass die Glucuronsäure mit dem Phenylhydrazin noch zwei andere Verbindungen liefert

beute, die bis auf Null sinken kann, Hydrazinverbindungen erhalten werden, die bald amorph, bald krystallinisch, verschiedene Schmelzpunkte zwischen 114° und 220° aufweisen und zumeist aus Gemischen der zahlreich möglichen Verbindungsformen, wie Hydrazon, Osazon, Hydrazid, Hydrazonhydrazid, Osazonhydrazid und Condensationsprodukten bestehen. Sie sind in Folge ihrer variirenden Zusammensetzung nicht nur durch die Analyse nicht zu identificiren, also zum Nachweis ungeeignet, sondern geben in Folge ihrer Schmelzpunkte leicht zu Täuschungen Anlass.

Daher beschäftigte sich der eine von uns auf Veranlassung des Herrn Prof. E. Salkowski mit der Einwirkung substituirtter Hydrazinbasen auf die Glucuronsäure und fand dabei im p-Bromphenylhydrazin¹⁾ ein zur Abscheidung der Glucuronsäure vortrefflich geeignetes Mittel. Beide Substanzen verbinden sich nämlich zu einer von der Concentration der Lösung und dem Verhältniss der Mengen von Glucuronsäure zu p-Bromphenylhydrazin unabhängigen Verbindung von der Zusammensetzung, $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$, die aus der freien Säure wie ihren wasserlöslichen Salzen in essigsaurer Lösung, aber unter Vermeidung eines Ueberschusses an freier Essigsäure in guter Ausbeute entsteht. Die Verbindung, deren Zusammensetzung unter allen Umständen der angeführten Formel entspricht und wahrscheinlich glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin von der Formel



darstellt, ist in Wasser unlöslich, scheidet sich daher sehr vollständig aus, ist leicht durch Waschen mit Alkohol zu reinigen und zeigt als Rohprodukt den Schmelzpunkt ca. 200—216°, nach etlichem Umkrystallisiren aus 60%igem Alkohol 236°. Diesen Grad der Reinheit braucht man aber

je nach der Anzahl der Moleküle Phenylhydrazin, die man auf das Glucuronsäuremolekül einwirken lässt, Verbindungen, welche in Folge ihrer Schmelzpunkte von 159° bzw. 205° zur Verwechslung mit Pentosazon und Hexosazon führen könnten, aber wahrscheinlich keine einheitlichen Körper darstellen.

¹⁾ C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 32, S. 2395—2398.

nicht zum Zwecke der Erkennung zu erreichen, sondern es trifft sich günstig, dass bei dem von einem von uns¹⁾ jüngst empfohlenen Pyridinverfahren für die Bestimmung der optischen Drehungsrichtung der Osazone die Verbindung der Glucuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin eine ausgesprochene Sonderstellung unter den Hydrazinverbindungen aller in Betracht kommenden Kohlehydrate einnimmt und dem schon recht reinen Rohprodukt vom Schmelzpunkt ca. 200—216° die gleiche Drehung wie der absolut reinen Substanz vom Schmelzpunkt 236° zukommt.

Löst man nämlich je 0,20 g Hydrazinverbindung in 4,0 ccm. gereinigten Pyridins und 6,0 ccm. absoluten Alkohols,²⁾ so erhält man im Laurent'schen Halbschattenapparat bei Natriumlicht folgende Drehungen:

l-Arabinosephenylosazon	+ 1° 10'
l-Arabinose-p-bromphenylosazon	+ 0° 28'
l-Xylosephenylosazon	— 0° 15'
l-Xylose-p-bromphenylosazon	+ 0°
Rhamnosephenylosazon	+ 1° 24'
d-Glucosephenylosazon	— 1° 30'
d-Glucose-p-bromphenylosazon	— 0° 31'
d-Galactosephenylosazon	+ 0° 48'
Sorbinosephenylosazon	— 0° 15'
Maltosephenylosazon	+ 1° 30'
Lactobiosephenylosazon	+ 0°
Glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin ³⁾	— 7° 25'

Man kann also die Glucuronsäure ohne Elementaranalyse durch die schnell ausführbare optische Bestimmung ihrer Bromphenylhydrazinverbindung mit absoluter Sicherheit erkennen

1) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 32, S. 3384—3388.

2) Genauere Angaben über die Ausführung siehe C. Neuberg, l. c.

3) Hieraus berechnet sich für diese Verbindung das abnorm hohe spezifische Drehungsvermögen von $[\alpha]_D^{20} = -369^\circ$. Da im allgemeinen die Uebertragungen der Drehungsbeträge am Kreisapparat bei D-Licht auf die Angaben empirisch geachteter Zuckerapparate für weisses Licht unzulässig sind, sobald die Lösungen, wie die der Osazone, gefärbt sind, möge hier die Drehung der Glucuronsäureverbindung bei Auerlicht in einem Saccharimeter angegeben sein. Sie ist unter den Bedingungen obiger Tabelle ungefähr gleich der einer 13,2% igen Traubenzuckerlösung.

und kann überdies die Hydrazinverbindung aus ihrer Lösung in Pyridin-Alkohol fast quantitativ durch Fällung mit Petroläther wieder abscheiden.¹⁾

Nachdem eine orientirende Bestimmung gezeigt hatte, dass sich diese an reiner Glucuronsäure gewonnenen Erfahrungen unter geeigneten Bedingungen zur Erkennung gepaarter verwenden lassen, combinirten wir unsere Methoden des Nachweises durch Säurespaltung ohne Reindarstellung und Gewinnung der Bromphenylhydrazinverbindung». Dieses Verfahren ermöglichte es uns, den Nachweis der gepaarten Glucuronsäuren im Harn nicht nur in pathologischen Fällen, zu erbringen, sondern deren Anwesenheit als integrirenden Bestandteil im normalen Harn mit völliger Sicherheit zu erkennen. Da die Ausbeuten an p-Bromphenylhydrazinverbindung aus reiner Glucuronsäurelösung etwa 80—85% betragen, ermöglicht dieses Verfahren im Gegensatz zu dem Nachweis durch die Orcinsalzsäurereaction einen, wenn auch rohen Schluss auf die Quantität der gepaarten Glucuronsäuren.

Die im folgenden beschriebenen Versuche sind alle mit menschlichem Harn angestellt.

A. Urochloralsäurehaltiger Harn.

Fünf Liter Harn, welche nach Zufuhr von 6 g Chloralhydrat entleert waren, wurden auf freiem Feuer bis auf 300 ccm. eingedampft. Da die Urochloralsäure, wie bekannt, durch Bleiessig fällbar ist, wurde der eingeeengte Harn mit Bleiessig ausgefällt:²⁾ der voluminöse Bleiniederschlag wurde dann mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, auf dem Filter ausgewaschen und nach Suspension in ca. 400 ccm. Wasser durch

1) Das wieder ausgefällte glucuronsaure p-Bromphenylhydrazin ist anfangs amorph und schwer filtrirbar, ballt sich aber nach einigen Tagen zu einer grobkörnigen, gut von der überstehenden Flüssigkeit trennbaren Masse zusammen.

2) Hierzu waren etwa 2 Liter Bleiessig erforderlich; eine Untersuchung lehrte uns aber, dass die gesammte Urochloralsäure schon in dem durch 750 ccm. bewirkten Niederschlag vorhanden ist. Dieselbe Erfahrung konnten wir bei anderen gepaarten Glucuronsäuren machen, deren Abscheidung durch dieses Verhalten erleichtert wird.

Einleiten von Schwefelwasserstoffgas zersetzt. Nach Trennung vom ausgeschiedenen Bleisulfid und Befreiung vom gelösten Schwefelwasserstoff restirten ca. 350 ccm. einer stark sauren, schwach gelb gefärbten Flüssigkeit, die Fehling'sche Lösung intensiv reducirte, eine starke Phloroglucin-, aber keine Orcinprobe gab und eine Linksdrehung von 3°, auf Traubenzucker berechnet, zeigte. Diese Lösung wurde nun der Spaltung mit Säure unterworfen. Obgleich zwar die gepaarten Glucuronsäuren durch Erwärmen mit verdünnter Säure auf freiem Feuer gespalten werden, zogen wir es vor, dem Beispiel von Tollens und Mann¹⁾ folgend, diese Zersetzung im Autoclaven vorzunehmen, eine Operation, durch welche allgemein die Zeit der Spaltung verkürzt und die die Ausbeute an Glycuronsäure schädigende Säuremenge auf ein Mindestmass beschränkt werden kann. Als Autoclav²⁾ bedienten wir uns einer Weissbierflasche aus Steingut von ca. 1 Liter Inhalt, die beim Gebrauch ausser durch ihren gummigedichteten Patentverschluss mit einem unter diesen eingepressten Kork verschlossen wurde. Die ganze Flasche war, um bei etwaiger Zertrümmerung gegen Splitter geschützt zu sein, mit Handtüchern umwickelt und die so entstandene feste Puppe wurde dann in einem offenen Eisentopf in einer sie völlig bedeckenden Wassermenge zugleich mit dieser vorsichtig angewärmt und dann eine Stunde lang bei 100° erhalten.

In dieser Flasche behandelten wir in der angegebenen Weise unsere 350 ccm. Flüssigkeit mit 3,5 g concentrirter Schwefelsäure, d. h. mit soviel, dass die Lösung ca. 1% freie H_2SO_4 enthielt. Nach völligem Erkalten wurde nun die Flasche geöffnet; die filtrirte Lösung war vollkommen klar und hellgelb gefärbt. Sie reducirte Fehling'sche Lösung, gab höchst intensive Phloroglucin- und Orcinreaction und zeigte eine

1) Tollens und Mann, Annal. d. Chem., 290, 1896.

2) Selbstverständlich kann hierzu jeder kleine Metallautoclav benützt werden; doch hat sich diese Anordnung gut bewährt. Zu den beschriebenen und etlichen anderen Versuchen hat ein und dieselbe Flasche gedient und hat sie überstanden. Da ihr Gebrauch unter den erwähnten Vorsichtsmassregeln gänzlich ungefährlich ist, kann sie mit Vortheil zur Verarbeitung kleiner Harnmengen benützt werden.

Rechtsdrehung von 0,35^o/₁₀₀, auf Traubenzucker berechnet. Diese Drehung entspricht etwa einem Gehalt von insgesamt 3,1 g Glucuronsäure.¹⁾

300 ccm. dieser Lösung wurden dann nach genauer Neutralisation durch Natriumcarbonat mit 8 g p-Bromphenylhydrazinacetat²⁾ behandelt und lieferten ca. 2 g Hydrazinverbindung, die als Rohprodukt den Schmelzpunkt 206^o besass und durch Drehungsbestimmung (0,2 g zeigten im Pyridin-Alkoholgemisch —7^o 30') als Glucuronsäurederivat erkannt wurde.

1) Dieser Versuch zeigt, in welcher reichlicher Ausbeute Urochloral säure aus Chloralhydrat erhalten werden kann. Denn nach der Theorie vermögen 165 g $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ (1 Mol.-Gew.) nach erfolgter Reduction zu Trichloräthylalkohol 194 g Glucuronsäure (1 Mol.-Gew.) zu binden oder je 1 g Chloralhydrat 1,17 g $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$. Im beschriebenen Versuch wurde aus 6 g verabreichtem Chloralhydrat 3,1 g Glucuronsäure erhalten oder, da theoretisch 7,02 g möglich wären, 43,0% der Theorie.

2) Da einerseits die Glucuronsäure namentlich in unreiner Lösung gegen Säuren und andererseits ihre Verbindung mit p-Bromphenylhydrazin gegen den Luftsauerstoff bei Wasserbadwärme empfindlich ist, muss man einen Ueberschuss an freier Essigsäure und den Zutritt der Luft möglichst vermeiden. Ersteres erreicht man am sichersten durch Anwendung von p-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und der erforderlichen Menge Natriumacetat, letzteres dadurch, dass man über das ins Wasserbad gehängte Becherglas eine Glasschale stülpt, so dass der über der Flüssigkeit befindliche Raum hauptsächlich von Wasserdämpfen erfüllt ist. Nach etwa 10 Minuten langem Erwärmen pflegt die Krystallabscheidung zu beginnen; man unterbricht dann die Erwärmung und filtrirt sofort durch ein bereit gehaltenes Faltenfilter. Beim Erkalten erfolgt reichliche Krystallisation; der entstandene hellgelbe Niederschlag wird an der Saugpumpe abfiltrirt, die Mutterlauge von Neuem im Wasserbad erhitzt, bei beginnender Krystallabscheidung abermals filtrirt, auf derselben Nutsche abgesaugt etc. und dieses so oft wiederholt, als erneutes Erhitzen weitere Niederschlagbildung bewirkt. Die gesammelte Hydrazinverbindung wird dann gründlich mit heissem Wasser und absolutem Alkohol gewaschen. Dabei nimmt sie eine leuchtend hellgelbe Farbe an und ist meistens ohne Weiteres zur optischen Untersuchung geeignet; enthält sie dunkle Partikelchen, so kann sie durch Auskochen mit absolutem Alkohol, Lösen in Pyridin und Ausfällen mit Ligroin leicht gereinigt werden.

B. Mentholglucuronsäurehaltiger Harn.

Nach Verabreichung von 10 g Menthol an zwei Personen wurden 4 Liter Harn erhalten, welcher schwache Linksdrehung zeigte, eine deutliche Phloroglucin, aber keine Orcinprobe gab und Fehling'sche Lösung nicht erheblich reducirte. Der Harn wurde auf freiem Feuer auf ca. 200 ccm. eingeeengt und gemäss der beim Chloralhydratharn gemachten Erfahrungen mit nur¹⁾ 500 ccm. käuflichem Bleiessig versetzt. Der erhaltene voluminöse Niederschlag wurde nach gehörigem Auswaschen in ca. 750 ccm. Wasser suspendirt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das vom entstandenen Schwefelblei getrennte Filtrat färbte sich nun bei der zur Entfernung des gelösten Schwefelwasserstoffs vorgenommenen Einengung stark dunkel und zeigte jetzt einen stark positiven Ausfall der Orcinreaction und der Reductionsprobe mit Fehling'scher Lösung. Gleichzeitig trat unverkennbar der stechende Geruch des freien Menthols auf. Dieses Verhalten zwang zu der Annahme, dass die Flüssigkeit freie Glucuronsäure enthalte, also bereits eine Spaltung der Mentholglucuronsäure stattgefunden haben müsse.

In der That steht diese Erscheinung vollkommen im Einklang mit der von dem einen von uns²⁾ nachgewiesenen leichten Spaltbarkeit der Mentholglucuronsäure, die sogar schon bei längerem Stehen eine theilweise Zersetzung erfährt.³⁾

Zur Vervollständigung der Spaltung wurde nun die 400 ccm. betragende Flüssigkeitsmenge mit 4 ccm. concentrirter

1) Auch hier liessen sich in dem Niederschlag, den erneuter Bleiessigzusatz im Filtrat der ersten Bleifällung bewirkte, keine gepaarten Glucuronsäuren mehr nachweisen.

2) P. Mayer, Berl. klin. Wochenschrift, 1900, Nr. 1.

3) Die ausserordentliche Leichtigkeit, mit der diese Spaltung hier eintrat, macht es wahrscheinlich, dass sie durch die Gegenwart freier starker Säuren begünstigt gewesen sei. Die Titration einer Probe zeigte denn auch, dass der Gehalt an freier Säure erheblich die Menge überstieg, welche an freier Mentholglucuronsäure selbst bei quantitativem Uebergang des verabreichten Menthols in diese Verbindung hätte entstehen können. Die Anwesenheit dieser Mengen von freien, spaltend wirkenden Säuren findet nun sehr einfach dadurch ihre Erklärung, dass aus dem eingeeengten Harn ausser der Mentholglucuronsäure natürlich eine Anzahl anorganischer Salze durch Bleiessig niedergeschlagen wird,

Schwefelsäure im Autoclaven behandelt. Nach dieser Operation zeigte die Flüssigkeit eine Rechtsdrehung von 0,15 g und reducirte Fehling'sche Lösung schon bei gelinder Wärme; nach genauer Neutralisation wurde sie in der beschriebenen Weise mit 10 g p-Bromphenylhydrazinacetat behandelt und lieferte hierbei ca. 1 g reiner Hydrazinverbindung, die durch Bestimmung ihres Schmelzpunktes und ihrer optischen Drehung als die gesuchte identificirt wurde.

C. Thymolglucuronsäurehaltiger Harn.

Nach Eingabe von 4 g Thymol entleerter Harn zeigte eine Linksdrehung von 0,2%, auf Traubenzucker berechnet, reducirte Fehling'sche Lösung nicht, gab eine positive Phloroglucinprobe, aber keine Orcinreaction. Die 1200 cem. betragende Harnmenge wurde mit Bleiessig versetzt und der entstandene Bleiniederschlag in der früher beschriebenen Weise behandelt. Die nach der Einwirkung von Schwefelwasserstoff resultirende Lösung von 200 cem., welche eine Linksdrehung von 0,7% zeigte, wurde mit 2 cem. concentrirter Schwefelsäure in der als Autoclav dienenden Steingutflasche unter den oben geschilderten Vorsichtsmaßregeln erhitzt. Die nach der Spaltung erhaltene Lösung zeigte alle der freien Glucuronsäure zukommenden Reactionen und eine Rechtsdrehung von 0,2% Traubenzucker, entsprechend einem Gehalt von ca. 1,1 g Glucuronsäure. Auch hier gelang es, mit dem p-Bromphenylhydrazin eine Verbindung darzustellen, die sich durch die Bestimmung ihrer optischen Drehung als Glucuronsäurederivat erwies.

Nachdem uns nach diesem Verfahren der Nachweis dreier verschiedener gepaarter Glucuronsäuren ohne besondere Schwierigkeiten gelungen war, lag es nahe, im normalen Harn nach Glucuronsäureverbindungen zu suchen, da derselbe Eigenschaften besitzt, welche das Vorhandensein gepaarter Glucuronsäuren in ihm vermuthen lassen.

so besonders Chloride, Sulfate und Phosphate, die ebenso wie stets mit niedergedrungenes Bleisubacetat nach Entfernung ihrer Basis durch Schwefelwasserstoff ihre freigemachte Säure zusammen mit der freien Mentholglucuronsäure in das Filtrat vom Bleisulfid liefern.

D. Normaler Harn.

Schon im Jahre 1876 hat Haas¹⁾ festgestellt, dass fast jeder normale Harn die Ebene des polarisirten Lichtes nach links dreht, welche Beobachtung später von Johannowsky, Galippe, E. Külz²⁾ und Anderen bestätigt wurde, welche die linksdrehende Substanz des normalen Harns näher untersucht haben. Haas macht von derselben folgende Angaben: «Durch Concentration reichert sich der Harn an der fraglichen Verbindung an: sie dreht in neutraler, saurer und alkalischer Lösung die Ebene des polarisirten Lichtes nach links, büsst diese Fähigkeit aber in stark alkalkalischer Lösung, wie sie Natriumcarbonat und Ammoniak erzeugen, ein, erlangt sie jedoch nach Ansäuerung wieder. Die nicht flüchtige Substanz wird dem eingedickten Harn durch Alkohol entzogen, von Thierkohle zum Theil zurückgehalten, weder von Bleizucker noch Bleiessig, dagegen von Bleiessig und Ammoniak gefällt. Zersetzt man den in Wasser suspendirten Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff, so enthält das wässerige Filtrat nicht die drehende Substanz, doch lässt sich diese dem Niederschlag von Schwefelblei durch heisses Wasser oder besser durch Alkohol entziehen, ist nun aber rechtsdrehend und reducirt alkalische Kupferlösung auch in der Wärme nicht.

Vorzugsweise auf Grund dieser Angaben, denen Külz noch einige hinzufügte, ist von verschiedenen Seiten die Vermuthung ausgesprochen worden, dass der normale Harn Glucuronsäureverbindungen enthalte. Doch lassen sich gerade die von Haas gemachten Angaben über die fragliche linksdrehende Substanz mit unseren heutigen Kenntnissen über gepaarte Glucuronsäuren nicht in Einklang bringen. Denn sie zwingen entweder zu der Annahme, dass es rechtsdrehende gepaarte Glucuronsäuren gibt — bis jetzt sind jedoch nur linksdrehende bekannt — oder zu der Ansicht, dass bei seiner Versuchsanordnung eine mehr oder minder vollkommene

1) Haas, Centralbl. f. d. medic. Wissensch. 1876. 149.

2) Külz, Zeitschr. f. Biologie, 20, 166; 23, 338.

Galippe, Gazette med. de Paris, 1880, 259.

Johannowsky, Archiv f. Gynäkologie, 12, 1887.

Spaltung der Harnglucuronsäure in den betreffenden Alkohol und freie rechtsdrehende Glucuronsäure erfolgt ist; dann aber ist die Schwerlöslichkeit in Wasser und das Ausbleiben der sonst schon bei gelinder Wärme eintretenden Reduction alkalischer Kupferlösung unverständlich.

Wir haben denn auch im Verlauf unserer Untersuchung die Angaben von Haas gerade in diesen wesentlichen Punkten nicht bestätigen können und neigen der Meinung Huppert's¹⁾ zu, welche dieser über ähnliche Beobachtungen von Külz²⁾ an Harn von Pflanzenfressern äussert, dass es sich vielleicht um ein Gemisch verschiedener Substanzen, etwa Eiweisskörper, gehandelt haben möge.

Besonders eingehend hat Flückiger³⁾ die Frage, ob im normalen Harn Glucuronsäure vorkommt, erörtert und spricht sich dahin aus, dass jeder Harn Glucuronsäure enthält, der ein gewisser Antheil an der Reduction des normalen Harnes zukommt. Einen einwandfreien Beweis für seine Anschauung konnte er natürlich bei den damaligen mangelhaften Methoden für den Nachweis der Glucuronsäure nicht erbringen. Der eine von uns⁴⁾ hat nun in seiner ersten Arbeit über die Glucuronsäure Untersuchungen mitgetheilt, welche die Anschauung von Flückiger wesentlich zu stützen geeignet sind. Da es ihm gelang, in einer Reihe von normalen Harnen, welche eine Linksdrehung bis zu 0,2% zeigten, einen positiven Ausfall der Orcinprobe nach dem Erhitzen mit H_2SO_4 zu erzeugen, hielt er es für sehr wahrscheinlich, dass in jedem Harn geringe Mengen gepaarter Glucuronsäuren vorhanden sind.

Wir hofften nun, durch die Combination unserer Methoden der Säurespaltung und Darstellung der Bromphenylhydrazinverbindung diese Annahme zur Sicherheit erheben zu können. Denn da der Nachweis, dass die Glucuronsäure ein normaler Harnbestandtheil ist, nur durch die Darstellung der Glucuronsäure selbst oder einer charakteristischen Glucuronsäure-

1) Huppert, Analyse des Harns, 1898, S. 202.

2) Külz, a. a. O.

3) Flückiger, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 9 (1885).

4) P. Mayer, Berl. klin. Wochenschr., 27 u. 28, 1899.

verbindung geführt werden kann, musste es uns gelingen, wenn der Harn wirklich Glucuronsäure enthält, die Bromphenylhydrazinverbindung derselben darzustellen.

Gleichzeitig lag es in unserem Plan, über die Natur der betreffenden Glucuronsäureverbindungen einiges zu eruiren, indem wir naturgemäss auf diejenigen Glucuronsäureverbindungen, welche man zunächst im normalen Harn vermuthen musste — Phenyl-, Indoxyl-, Skatoxyl-Glucuronsäure — unser Augenmerk richteten.

Nachdem wir zunächst einen Versuch mit 5 Liter Harn ohne Erfolg angestellt hatten, nahmen wir 50 Liter normalen Harnes in Angriff und verfahren bei seiner Verarbeitung ähnlich, wie wir es bei Harnen nach Chorallhydrat-, Menthol- und Thymolgenuss mit Erfolg gethan. Der Harn wurde in Portionen von je 5 Liter in emaillirten Eisenschalen Anfangs auf freiem Feuer, zuletzt auf dem Wasserbad bis zu einem kleinen Volumen eingedampft, wobei das zur Conservirung zugefügte Chloroform entwich. Alle vereinten Rückstände wurden dann gemeinschaftlich auf dem Wasserbad bis auf etwa 2 Liter eingeengt. Ohne sie von den massenhaft auskrystallisirten Salzen zu trennen, wurden sie auf 3 grosse Schütteltrichter vertheilt, mit Schwefelsäure bis zur starksauren Reaction versetzt und mit je einem Liter eines Alkoholäthergemisches im Verhältniss 1:3 ausgeschüttelt. Die Alkoholätherauszüge wurden dann in Portionen von ca. $\frac{1}{2}$ Liter auf dem siedenden Wasserbad abdestillirt, das aufgefangene Alkoholäthergemisch unter Ersatz des verdunsteten zu neuen Ausschüttelungen verwandt, und diese mit jedem der drei Schütteltrichter 8 bis 10 Mal wiederholt, bis die Auszüge nur noch schwach gelbe Farbe besaßen. Die Rückstände aller Auszüge wurden in einem Kolben gesammelt und durch nochmaliges Erwärmen auf dem Wasserbad von anhaftenden Alkohol- und Aetherresten befreit; der nunmehr wässrige Rückstand wurde dann ohne Rücksicht auf sich ausscheidende Substanzen zu $1\frac{1}{2}$ Liter verdünnt und der systematischen Bleibehandlung unterworfen, d. h. erst mit Bleizucker ausgefällt (Niederschlag I), dann mit Bleiessig (Niederschlag II) und zum Schluss mit Bleiessig und Ammoniak (Niederschlag III). Alle 3 Niederschläge wurden

dann in je 1 Liter H_2O suspendirt und mit H_2S zersetzt. Das vom Schwefelblei getrennte Filtrat der Bleizuckerfällung (Niederschlag I) zeigte weder Drehung noch Reaction mit Phloroglucin oder Orcin, auch keine Reduction gegen Fehling'sche Lösung, und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Dagegen zeigte das vom Bleisulfid getrennte und durch Einengen auf ca. 300 ccm. vom Schwefelwasserstoff befreite Filtrat der Bleiessigfällung (Niederschlag II) ein ganz anderes Verhalten. Die Reductionsprobe mit Fehling'scher Lösung war negativ, der Ausfall der Phloroglucinprobe und der Orcinreaction positiv. Vor Allem aber zeigte die Lösung eine deutliche Linksdrehung entsprechend einem Gehalt von 0,8% Traubenzucker. Dieselbe wurde nun nach Zusatz von 3 ccm. concentrirter Schwefelsäure in der als Autoclav dienenden Steingutflasche eine Stunde lang auf der Temperatur des siedenden Wassers gehalten: nach völligem Erkalten wurde der Inhalt ausgegossen und nachgespült. Die schwach gelb gefärbte Flüssigkeit, deren Menge jetzt ca. 360 ccm. betrug, zeigte nun eine Rechtsdrehung von 0,2%, auf Traubenzucker berechnet, entsprechend einem ungefähren Gehalt von insgesamt ca. 1,9 g freier Glucuronsäure. Eine mit Natronhydrat alkalisch gemachte Probe reducirte Fehling'sche Lösung stark bei gelinder Wärme und zeigte alle übrigen Reductionserscheinungen der Glucuronsäure gegen alkalische Wismuth- und Quecksilberlösung, reducirte auch ammoniakalische Silberlösung unter Spiegelbildung: Orcin- und Phloroglucinreaction waren ausserordentlich stark. 250 ccm. wurden dann zur Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung mit 8 g p-Bromphenylhydrazinacetat behandelt und lieferten unter Einhaltung der früher beschriebenen Vorsichtsmassregeln etwa 1,1 g Hydrazinverbindung vom Schmelzpunkt 202° , die durch Drehungsbestimmung und Stickstoffanalyse als Glucuronsäureverbindung bestätigt wurde.

I. 0,2 g drehten im Decimeterrohr im Pyridinalkoholgemisch $-7^{\circ} 10'$

II. Angewandte Substanz: 0,1770 g.

Erhalten: $N = 11,4$ ccm. bei 14° und 756 mm.

Gefunden: $N = 7,51\%$; berechnet für $C_{14}H_{17}O_7N_2$ Br : $N = 7,35\%$.

30 ccm. noch restirender, im Autoclaven gespalten

Flüssigkeit wurden zur Bestimmung des Glucuronsäurepaarlings verwendet. Von den 3 zunächst in Betracht kommenden gepaarten Glucuronsäuren, Phenolglucuronsäure, Indoxylglucuronsäure und Skatoxylglucuronsäure, kommt den beiden letzteren wahrscheinlich eine Reductionsfähigkeit zu, da zu Folge der Versuche von Hoppe-Seyler und Mester¹⁾ der Harn nach Zufuhr von Indol und Skatol stärker reducirt, während die Phenolglucuronsäure, wie Külz²⁾ festgestellt hat, keine reducirenden Eigenschaften hat. Nachdem nun unsere Lösung vor der Spaltung alkalische Kupferlösung nicht reducirt hatte, war es von vornherein wahrscheinlich, dass es sich um Phenolglucuronsäure handeln würde. Um dies zu entscheiden, wurde die Flüssigkeit aus einem kleinen Siedekolben der Destillation unterworfen. Das farblose Destillat zeigte nun in der That starke Phenolreaction;³⁾ es gab mit Bromwasser einen dichten Niederschlag und färbte sich mit Bromkalk und Ammoniak lebhaft blaugrün. Dagegen liess sich weder Indoxyl noch Skatoxyl nachweisen. Durch diesen Befund war also das Vorhandensein von Phenolglucuronsäure im normalen Harn mit Sicherheit bewiesen.

Der gleichen Procedur wurde nun die letzte der Bleifällungen, der Bleiessigammoniakniederschlag, unterworfen. Das nach Trennung von Schwefelblei zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs auf 255 cem. eingeengte Filtrat zeigte eine Linksdrehung von 0,15^o/₁₀₀, gab eine schwache Phloroglucin- und Orcinreaction und reducirte Fehling'sche Lösung in geringem Grade. Nach Zusatz von 2,5 cem. concentrirter H₂SO₄ wurde die Flüssigkeit alsdann eine Stunde lang in der Druckflasche auf 100° erhalten. Nach dem Erkalten war die Linksdrehung verschwunden, und die Flüssigkeit zeigte jetzt starke Orcin- und Phloroglucinreaction, sowie deutliche Reductionswirkung gegen Fehling'sche Lösung. Nach nochmaligem Erhitzen im Autoclaven auf 100° während einer Stunde

1) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VII, 1882/1883; Mester, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XII, 1888.

2) E. Külz, Pflüger's Archiv, 30, 485.

3) Phenol als Sammelbegriff für Phenol und Kresol.

zeigte die zuvor inactive Flüssigkeit eine minimale Rechtsdrehung: doch wurde wegen ihrer Kleinheit vom Darstellungsversuch der Bromphenylhydrazinverbindung von vornherein Abstand genommen. Die Anwesenheit einer gepaarten Glucuronsäure im ursprünglichen Bleiessigammoniak-Niederschlag war nach erfolgter Spaltung durch den positiven Ausfall aller Reactionen der freien Glucuronsäure ausser Zweifel gesetzt, umsomehr, da wir in der gespaltenen Flüssigkeit nun ohne Schwierigkeit die alkoholische Componente erkennen konnten. Bei der Jaffé'schen und der Obermayer'schen Indikanprobe zeigte nämlich unsere Flüssigkeit eine ausgesprochene Blau- bis Violettfärbung, so dass es wohl zweifellos ist, dass die in den Bleiessigammoniak-Niederschlag übergehende linksdrehende Substanz des normalen Harns Indoxylglucuronsäure, bezw. Skatoxylglucuronsäure ist. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden lässt sich aber durch die gewöhnlichen Proben nicht herbeiführen.

Was schliesslich die Quantität der im normalen Harn vorkommenden Glucuronsäure anlangt, so kann hier, wenn auch nur in ganz approximativer Weise, aus der Grösse der Rechtsdrehung nach erfolgter Spaltung auf die Menge der vorhandenen Glucuronsäure geschlossen werden, da die im normalen Harn in Betracht kommenden Paarlinge, Phenol, Indoxyl, Skatoxyl, keine optische Activität besitzen.

Der Gehalt der aus der Bleiessigfällung (Phenolglucuronsäure) nach Spaltung erhaltenen Lösung an Glucuronsäure betrug ca. 1,9 g. Rechnet man hierzu die geringe Menge Glucuronsäure, die aus der Bleiessig-NH₃-Fällung erhältlich ist, so kann rund ihre Gesamtmenge zu 2 g angenommen werden. In 50 Liter = 50000 ccm. sind also ca. 2 g. in 100 ccm. demnach 0,004 g Glucuronsäure. Diese Zahl bleibt selbstverständlich hinter dem wahren Werth zurück, da einmal im Verlauf der mannigfachen Operationen kleine Verluste unvermeidlich sind, hauptsächlich aber, weil man bei der Spaltung der betreffenden Glucuronsäuren es nicht in der Hand hat, die gesammte Glucuronsäure zu erhalten.¹⁾

¹⁾ Es ist sehr schwer, ein Optimum in der spaltenden Wirkung der Schwefelsäure zu erzielen, da die Glucuronsäure in dem Maass, wie sie gebildet, durch die Säure zum Theil wieder zersetzt wird.

Es liegt nun in der Litteratur eine Angabe über den muthmasslichen Gehalt des Harns an Glucuronsäureverbindungen vor. G. de Chalmot¹⁾ gewann bei der Destillation des Abdampfrückstandes von 200 cem. normalen Harns mit HCl ca. 0,025 g Furfurol. Unter der Annahme, dass allein Glucuronsäureverbindungen die furfurolgebenden Substanzen gewesen, würde diese Menge nach de Chalmot etwa 0,02 g Glucuronsäure in 100 cem. Harn entsprechen. Später zeigten aber Mann und Tollens,²⁾ dass de Chalmot die Menge des aus Glucuronsäure abspaltbaren Furfurols fast 3mal zu gross angenommen (46,0% gegen 17,27%). Unter Berücksichtigung dieser Thatsache reducirt sich der Werth von Chalmot auf ca. 0,007 g, der angesichts der erwähnten Fehlerquellen mit unserer Zahl in angenäherter Uebereinstimmung steht, zumal bei de Chalmot's Bestimmung noch andere Harnbestandtheile — stets vorhandene Zuckerspuren, thierisches Gummi etc. — als furfurolbildend in Betracht kommen.

Wenn wir die Resultate unserer Untersuchung zusammenfassen, so können wir sagen:

I. Durch die Spaltung mit Säure und die Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung lässt sich der Nachweis von Glucuronsäure im Harn in einwandsfreier Weise erbringen. Allerdings ist die Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung nur möglich, wenn der Harn erheblichere Mengen gepaarter Glucuronsäuren enthält. Für den gewöhnlichen klinischen Nachweis wird meistens die einfache Säurespaltung mit dem positiven Ausfall der Orcinprobe genügen.

II. Durch vorliegende Untersuchung ist zum ersten Male der Beweis erbracht worden, dass die Glucuronsäure in gepaarter Form ein normaler Harnbestandtheil ist, und zwar ist sie in demselben — insoweit die Frage nach der Natur der Paarlinge im Rahmen der vorstehenden Versuche ihre Erledigung gefunden hat — grösstentheils an Phenol, zum kleineren Theil an Indoxyl, bezw. Skatoxyl gebunden.

1. G. de Chalmot, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 25, 2571.

2. Mann und Tollens, Ann. d. Chem., 290, 156.