

Die quantitative Bestimmung der β -Oxybuttersäure im Harn.

Von
Ernst Darmstaedter.

(Aus dem Laboratorium der medicin. Klinik zu Heidelberg.)

(Der Redaction zugegangen am 24. Januar 1903.)

Von allen bis jetzt bekannten Methoden zur Bestimmung der β -Oxybuttersäure wird keine den Anforderungen gerecht, die man an sie stellen muss. Umständlichkeit und Mangel an Genauigkeit sind ihre Hauptfehler.

Die neueste Methode, die von Bergell angegeben ist,¹⁾ ist zwar ziemlich einfach, aber sie fusst, ebenso wie verschiedene ältere Bestimmungen, auf der Untersuchung der Linksdrehung der β -Oxybuttersäure. Die Polarisationsmethode kann aber, abgesehen von anderen Mängeln, schon deshalb nicht ganz zuverlässig sein, weil die Gegenwart noch anderer drehender Substanzen im diabetischen Harn nicht ausgeschlossen ist.

Ich bemühte mich, auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. Brauer, eine Bestimmungsmethode zu finden, die, bei grosser Genauigkeit, so einfach ist, dass sie ohne grosse Hilfsmittel von jedem Arzte ausgeführt werden kann.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Brauer auch an dieser Stelle für die grosse Liebenswürdigkeit zu danken, mit der er mich in jeder Weise bei der Ausführung dieser Arbeit unterstützte.

Nach verschiedenen fehlgeschlagenen Versuchen kam ich zu der Ueberzeugung, dass es am besten sei, wenn möglich, von der Bestimmung der Oxybuttersäure, als solcher, abzusehen und sie in eine Substanz von besseren Eigenschaften über-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 310.

zuföhren. Eine derartige Verbindung ist die Crotonsäure, die durch Wasserabspaltung aus der β -Oxybuttersäure entsteht:



Diese Reaction ist schon vor längerer Zeit zum qualitativen Nachweis der Oxybuttersäure benutzt worden: zuerst wohl von Kütz., der den eingedampften Harn mit concentrirter Schwefelsäure destillirte. Zu quantitativen Zwecken ist die Reaction nie benutzt worden, sei es, dass man dies von vornherein als unmöglich betrachtete, sei es, dass flüchtige Versuche schlechte Resultate ergaben.

Zum qualitativen Nachweis eignet sich die Ueberführung in Crotonsäure in hohem Grade. Die Angabe von Magnus-Levy,¹⁾ dass bei der Ueberführung der β -Oxybuttersäure in Crotonsäure die letztere häufig sich nicht krystallisirt gewinnen und somit nicht identificiren lässt, kann nicht als richtig anerkannt werden. Bei der Destillation von Harn mit Schwefelsäure gehen ja allerdings, ausser Crotonsäure, einige andere flüchtige Substanzen mit über, z. B. p-Kresol. Die Menge dieser Verunreinigungen ist jedoch meist so gering, dass es genügt, die Substanz auf Thon abzapressen, um die Crotonsäure am Schmelzpunkt zu erkennen. Wenn sehr wenig Crotonsäure vorhanden ist, löst man dieselbe in Wasser, wobei die Verunreinigungen (Kresol, Salicylsäure etc.) zurückbleiben, zieht die Crotonsäure mit Aether aus und bestimmt nach Verdunsten des Aethers den Schmelzpunkt.

Um zu erkennen, ob die Umwandlung der β -Oxybuttersäure in α -Crotonsäure auch zur quantitativen Bestimmung geeignet ist, wurde eingehend das Verhalten der Oxybuttersäure bei der Destillation untersucht. Nähere Angaben finden sich bis jetzt nur über das Verhalten der Oxybuttersäure bei der Destillation in wässriger Lösung.²⁾ Araki fand, dass hierbei nur eine kleine Menge Crotonsäure sich bildet und in das Destillat übergeht, und dass bei zunehmender Concentration der Lösung, mehr Crotonsäure erhalten wird.

1) Arch. für experiment. Pathol. u. Pharmak., Bd. 45, S. 398.

2) Araki, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 1.

Es war ja von vornherein anzunehmen, dass eine Reaction, die auf Wasserabspaltung beruht, in wässriger Lösung nicht gut verlaufen kann.

Ich untersuchte zuerst die Einwirkung von Wasserdampf auf β -Oxybuttersäure in wässriger Lösung, da hierüber noch keine genauen Angaben zu finden waren.

β -Oxybuttersäure wurde in einem Kolben in Wasser gelöst. Durch diese Lösung wurde Wasserdampf hindurchgeleitet. Es wurden angewandt: 0,5118 g Säure von 82,8% Gehalt = 0,4237 g reine β -Oxybuttersäure.

Nachdem vier Stunden Wasserdampf durch die wässrige Lösung hindurchgeleitet worden war wurden Destillat und Rückstand mit Natronlauge $\frac{1}{10}$ N. titirt.

Im Destillat waren zur Sättigung nöthig:

2,8 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N.

das entspricht 0,02408 g Crotonsäure = 0,02913 g Oxybuttersäure.

Im Rückstand wurden verbraucht:

37,6 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N.

entspricht: 0,39104 g Oxybuttersäure.

zusammen: 0,42017

angewandt: 0,4237

Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Oxybuttersäure durch darübergeliteten Wasserdampf nur in ganz geringem Maasse angegriffen wird. Bei Anwendung von überhitztem Wasserdampfe ist das Ergebniss fast dasselbe.

Ich untersuchte dann das Verhalten der β -Oxybuttersäure bei der Destillation mit Schwefelsäure und arbeitete mit Lösungen, deren Concentration nicht genau bestimmt wurde und wohl bei jedem Versuche verschieden war. Die Ergebnisse waren sehr verschieden: Bald wurde wenig Crotonsäure im Destillate gefunden, bald erhielten wir die angewandte Menge β -Oxybuttersäure quantitativ wieder, in Form von Crotonsäure.

So verschieden auch die Resultate waren, so war doch daran zu erkennen, dass die Umwandlung der Oxybuttersäure

in Crotonsäure unter ganz bestimmten Bedingungen quantitativ verläuft.

Um diese Bedingung kennen zu lernen, stellte ich folgenden Versuch an:

1.3068 g Säure, enthaltend 1,0597 g reine β -Oxybuttersäure, wurden in 100 ccm 20%iger Schwefelsäure gelöst. Es wurde nun destillirt, das Destillat in drei Fractionen aufgefangen und der Gehalt an Crotonsäure bestimmt. Ich arbeitete immer in der Weise, dass ich das Destillat mit Aether extrahirte, den Aether abdestillirte, den Rückstand mit etwas Wasser aufnahm und mit Natronlauge $\frac{1}{10}$ N. titrirte.

Das Ergebniss des genannten Versuches war folgendes:

Tabelle I.

| Fraction | Menge des Destillates | Verbrauchte NaOH | Menge der Crotonsäure | Menge der entspr. Oxybuttersäure |
|----------|-----------------------|------------------|-----------------------|----------------------------------|
| I. | 33 ccm | keine | keine | keine |
| II. | 34 „ | 3.5 ccm | 0,0301 g | 0,0364 g |
| III. | 20 „ | 41,0 „ | 0,3526 „ | 1,4266 „ |

Von 1,0597 g β -Oxybuttersäure wurden also 0,4630 g wieder gefunden.

Man sieht aus dem Versuche, dass bei Gegenwart von verdünnter Schwefelsäure keine Crotonsäure gebildet wird, dass sich also verdünnte Schwefelsäure in diesem Falle wie eine verdünnte wässrige Lösung verhält. Erst bei beträchtlicher Concentration der Schwefelsäure wird reichlich Wasser abgespalten bzw. Crotonsäure gebildet.

Ferner sieht man, dass von sehr hoch concentrirter Schwefelsäure die β -Oxybuttersäure zerstört wird: auch als der Rückstand im Kolben verdünnt wurde, ging keine Spur Crotonsäure mehr über.

Es ist also nothwendig, mit einer Schwefelsäure von mittlerer Concentration zu arbeiten.

Dies geht auch aus folgendem Versuche hervor:

1.5067 g einer Säure, enthaltend 1,2217 g Oxybuttersäure, wurden in 100 ccm 50%iger Schwefelsäure (specifisches Gewicht 1,4) gelöst.

Die Lösung wurde destilliert und das Destillat in Fractionen aufgefangen. Der Gehalt an Crotonsäure wurde, wie oben angegeben, bestimmt.

Tabelle II.

| Fraction | Menge des Destillates | Verbrauchte NaOH | Menge der Crotonsäure | Menge der entspr. Oxybuttersäure |
|----------|-----------------------|------------------|-----------------------|----------------------------------|
| I. | 35 ccm | 71 ccm | 0.6106 g | 0.7388 g |
| II. | 22 „ | 12.5 „ | 0.1075 „ | 0.1290 „ |

Von 1,2217 g angewandter β -Oxybuttersäure wurden also 0,8678 g wieder gefunden = 71,03%.

Der Versuch zeigt, dass die Bildung der Crotonsäure bei Anwendung einer Schwefelsäure von etwa 50% Gehalt vorzüglich vor sich geht, dass aber bei steigender Concentration der Schwefelsäure die Crotonsäure zerstört wird. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, geht die Bildung der Crotonsäure sehr schnell vor sich: In den ersten 35 ccm des Destillates sind schon 0.6106 g Crotonsäure enthalten. Sind also kleinere Mengen β -Oxybuttersäure vorhanden, oder nimmt man eine grössere Menge Schwefelsäure, so sind leicht richtige Resultate zu erreichen, wie z. B. der folgende Versuch zeigt:

0,9068 g einer Oxybuttersäure, enthaltend 0,7502 g reine Oxybuttersäure, wurden in 150 ccm Schwefelsäure von 50% Gehalt gelöst und destilliert.

Zur Sättigung waren nöthig 72 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N. = 0,6192 g Crotonsäure = 0,7492 g β -Oxybuttersäure = 99,8% der angewandten Säure.

Ich habe bis jetzt bewiesen, dass die Umwandlung der β -Oxybuttersäure in Crotonsäure unter gewissen Bedingungen, nämlich bei Anwendung einer genügenden Menge etwa 50%iger Schwefelsäure, vollständig quantitativ und leicht vor sich geht.

Trotzdem ist diese Arbeitsweise für den Gebrauch nicht genügend zuverlässig, da bei Gegenwart von zu wenig Schwefelsäure das Resultat falsch wird. Auch wäre es unbequem, mit grossen Mengen einer ziemlich concentrirten Schwefelsäure zu arbeiten.

Dieser Uebelstand wird nun leicht dadurch beseitigt, dass man mit einer Schwefelsäure von constanter Concentration destillirt, was sich einfach in der Weise erreichen lässt, dass man in dem Maasse Wasser in den Destillationskolben gelangen lässt, als solches abdestillirt. Bei dieser Arbeitsweise sind Substanzverluste ausgeschlossen.

Aus folgendem Versuche ist ersichtlich, wie viel Zeit nöthig ist, um eine bestimmte Menge β -Oxybuttersäure in Crotonsäure umzuwandeln und zu destilliren.

3.1085 g einer Säure, enthaltend 2.5716 g reine β -Oxybuttersäure, wurden in 150 ccm 50% iger Schwefelsäure gelöst und destillirt. Das Destillat wurde in Fractionen aufgefangen und bestimmt.

Tabelle III.

| Fraction | Dauer der Destillation | Menge des Destillates | Menge der NaOH |
|----------|------------------------|-----------------------|----------------|
| I. | 20 Minuten | 46 ccm | 36.5 ccm |
| II. | 20 „ | 50 „ | 46.0 „ |
| III. | 40 „ | 90 „ | 80.0 „ |
| IV. | 40 „ | 100 „ | 83.5 „ |
| | 2 Stunden | 286 ccm | 246.0 ccm |

Die verbrauchten 246 ccm NaOH $^{1/10}$ N. entsprechen 2.1456 g Crotonsäure = 2.56 g β -Oxybuttersäure = 99.61% der angewandten Substanz.

Wie die Tabelle zeigt, geht die Destillation sehr gleichmässig vor sich. In einer Stunde können bei mässigem Erhitzen etwa 1.25 g Oxybuttersäure in Crotonsäure umgewandelt und destillirt werden.

Es ist noch zu beachten, dass bei der Destillation von diabetischem Harn mit Schwefelsäure kleine Mengen anderer Substanzen, ausser Crotonsäure, übergehen. Es kommen in Betracht: p-Kresol, Salicylsäure und Fettsäuren. Die Mengen dieser Körper, die bei der Destillation mit Schwefelsäure übergehen, sind im Allgemeinen so gering, dass sie das Resultat

der Bestimmung der Oxybuttersäure kaum beeinflussen. Bei der Destillation von 100 cem normalem Harn mit Schwefelsäure erhielt ich eine geringe Menge Substanz, die 0,5 cem NaOH $\frac{1}{10}$ N. zur Sättigung brauchte. Bei der Destillation eines sehr stark diabetischen Harnes erhielt ich eine ganz reine Crotonsäure, die ohne Weiteres genau den richtigen Schmelzpunkt zeigte.

Um bei der Bestimmung der Oxybuttersäure bzw. Crotonsäure jeden Fehler zu vermeiden, verfährt man am besten in der Weise, dass man nach Verdunsten des Aethers kurze Zeit auf dem Sandbade bei etwa 150° erhitzt, wobei etwa vorhandene Fettsäuren sich verflüchtigen. Nach dem Erkalten nimmt man mit Wasser auf; wobei die Crotonsäure sich löst und Verunreinigungen, wie z. B. Kresol, ungelöst bleiben.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich folgende Methode für die Bestimmung der β -Oxybuttersäure:

100 cem des zu untersuchenden Harnes werden mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade bis fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 150—200 cem Schwefelsäure von 50—55% Gehalt an H_2SO_4 in einen Kolben von 1 Liter Inhalt gespült, der mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen wird. Dieser ist mit einem gebogenen Glasrohr mit Kühler und einem Tropftrichter versehen. Man erhitzt nun Anfangs vorsichtig mit kleiner Flamme, um das Aufschäumen der Flüssigkeit zu vermeiden, dann kräftig und lässt aus dem Tropftrichter in dem Maße Wasser zutropfen, als dieses abdestilliert. Man erhitzt so lange, bis etwa 300—350 cem Flüssigkeit übergegangen sind, was in 2—2½ Stunden geschehen ist.

Das Destillat wird 2—3 Mal mit Aether ausgeschüttelt und der Aether abdestilliert. Man erhitzt nun einige Minuten auf dem Sandbade auf 160° , um etwa vorhandene Fettsäuren zu vertreiben, löst nach dem Erkalten in 50 cem Wasser, filtrirt von ungelösten Substanzen ab und wäscht mit etwas Wasser nach. Man titrirt nun die wässrige Lösung der Crotonsäure mit Natronlauge $\frac{1}{10}$ N., mit Phenolphthalein als Indicator.

100 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N. entsprechen 0,86 g Crotonsäure.
Crotonsäure mal 1,21 = Oxybuttersäure.

Wie meine zahlreichen Versuche zeigten, gibt diese Methode in allen Fällen sehr gute Resultate. Es seien hier nur einige Bestimmungen angeführt.

Ich benutzte eine β -Oxybuttersäure, die ich theils selbst nach dem Verfahren von Wislicenus¹⁾ darstellte, theils von Merck bezog.

1. 100 ccm normaler Harn wurden mit 0,6550 g Säure versetzt, enthaltend nach Analyse 0,5037 g reine Oxybuttersäure, alkalisch gemacht, eingedampft, mit 50% iger Schwefelsäure $1\frac{1}{2}$ Stunden destillirt, etc. etc.

Es wurden verbraucht 48 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N., entsprechend 0,4148 g Crotonsäure = 0,5019 g β -Oxybuttersäure = 99,64%.

2. 100 ccm normaler Harn wurden mit 1,3912 g Säure, enthaltend 1,1282 g Oxybuttersäure, versetzt und wie oben behandelt.

Es wurden verbraucht 108 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N., entsprechend 0,9288 g Crotonsäure = 1,123 g Oxybuttersäure = 99,53%.

3. 100 ccm normaler Harn wurden mit 1,3310 g Säure, enthaltend 1,1011 g Oxybuttersäure, versetzt und wie oben behandelt.

Es wurden verbraucht 105,5 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N., entsprechend 0,9073 g Crotonsäure = 1,0978 g Oxybuttersäure = 99,70%.

Dass Zucker den Gang der Bestimmung nicht stört, zeigt folgender Versuch:

4. 100 ccm normaler Harn wurden mit 10 g Traubenzucker und 0,8925 g Säure, enthaltend 0,7383 g Oxybuttersäure, versetzt und wie oben behandelt.

Es wurden verbraucht 70,5 ccm NaOH $\frac{1}{10}$ N., entsprechend 0,6063 g Crotonsäure = 0,7336 g Oxybuttersäure = 99,36%.

1) Liebig's Annalen, 149, 205.