

Quantitative Bestimmung gepaarter Glukuronsäuren.¹⁾

IX. Mitteilung über Glukuronsäure.

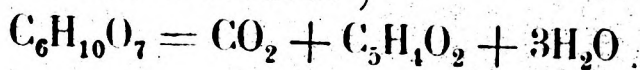
Von

Carl Neuberg und Wilhelm Neimann.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Februar 1905.)

Die quantitative Bestimmung der Glukuronsäure, die für eine große Reihe von physiologischen Fragen von besonderem Werte wäre, ist bisher ein ungelöstes Problem. Die Darstellung der Bromphenylhydrazinverbindung²⁾ gestattet zwar die Ermittlung von Minimalwerten, jedoch gelingt die Überführung in diese Verbindung keineswegs quantitativ. Die Hauptschwierigkeiten aber, die sich einer quantitativen Bestimmung der Glukuronsäure entgegenstellen, haben ihre Ursache in ganz anderen Verhältnissen.

Da sich die Glukuronsäure in Naturprodukten niemals frei, sondern stets in gebundener Form findet, so muß eine Lösung aus der gepaarten Verbindung jeder weiteren Prozedur voraufgehen. Diese wird nun durch Erhitzen allein, mit Säuren bei 100°, oder unter Druck vorgenommen. Hierbei kommt es stets in mehr oder minder erheblichem Maße zu einer Spaltung in Kohlensäure und Furfurol³⁾



¹⁾ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen chemischen Gesellschaft vom 25. Januar 1904.

²⁾ C. Neuberg, Ber. der Deutschen chem. Gesellsch., Bd. XXXII, S. 2395 (1899).

³⁾ Bekanntlich haben Tollens und seine Mitarbeiter (Ber. der Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXV, S. 2569, und Annalen der Chemie, Bd. CCLIV, S. 333; Bd. CCXC, S. 156 etc.) auf die Bestimmung des Furfurols ein Verfahren zur quantitativen Ermittlung des Pentosegehaltes

Für eine rationelle Bestimmungsmethode ist es demnach Vorbedingung, diese Faktoren zu vermeiden. Das kann am besten geschehen, indem man die Glukuronsäure, in dem Maße wie sie aus der gepaarten Verbindung abgespalten wird, in eine unempfindliche Substanz überführt.

Eine allgemein gültige Lösung dieser Aufgabe ist durch die vorliegenden Untersuchungen nicht erreicht worden. Allein das erwähnte Ziel läßt sich für eine Reihe von Verbindungen (Phenolglukuronsäure und ihre Homologen), deren quantitative Bestimmung von klinischen Gesichtspunkten aus von besonderer Wichtigkeit ist, auf folgendes Prinzip gründen:

Bekanntlich hat Thierfelder¹⁾ gefunden, daß Glukuronsäure durch verdünnte Salpetersäure oder glatter durch Bromwasser zu d-Zuckersäure oxydiert wird. Diese ist nun eine sehr beständige Verbindung, für die sich eine ganze Reihe von Bestimmungsmethoden ergibt. Hydrolysiert man also gepaarte Glukuronsäuren durch Erhitzen mit ein- bis dreiprozentiger Bromwasserstoffsäure bei Gegenwart von Brom im geschlossenen Rohre bei ca. 100°, so erreicht man, daß die Glukuronsäure in dem Grade, wie sie aus der gebundenen Form in die freie übergeht, zu Zuckersäure oxydiert wird. Dieser Vorgang vollzieht sich nun einigermaßen quantitativ nur bei der Phenolglukuronsäure, ist weniger vollständig bei der Mentholglukuronsäure und versagt völlig aus unbekanntten Gründen bei der Euxanthinsäure und Urochloralsäure. Die Abscheidung der Zuckersäure erfolgt nach meinen Erfahrungen am besten in Form ihrer basischen Baryumverbindung, welche dann in das Silbersalz²⁾ $\text{Ag. OOC}-(\text{CHOH})_4-\text{COO. Ag}$ verwandelt wird.

gegründet und dieses auch auf die gepaarten Glukuronsäuren auszudehnen versucht. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die gepaarten Glukuronsäuren bei der Salzsäuredestillation wechselnde und durchaus nicht die theoretischen Mengen Furfurol ergeben. Hinzu kommt, daß unter physiologischen Bedingungen die gepaarten Glukuronsäuren sich fast stets in Gesellschaft von Pentosanen und Nucleoproteiden, deren gesonderte Bestimmung bisher nicht möglich ist, vorfinden.

¹⁾ H. Thierfelder. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 3148.

²⁾ Tollens und Gans. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXI, S. 2149.

Der Vorteil dieses Verfahrens, dessen Prinzip sich unter Variierung der Bedingungen auch auf andere Glukuronsäureverbindungen übertragen lassen wird, ist der, daß Pentosen und pentosehaltige Produkte die Ausführung desselben nicht stören, indem jene Verbindungen, soweit sie überhaupt angegriffen werden, höchstens in die Monokarbonsäure der Fünftkohlenstoffzucker übergehen, welche durch Baryt nicht gefällt werden. Da nun die im Harn normalerweise¹⁾ auftretenden Glukuronsäureverbindungen der Phenolreihe angehören, so ist für diese physiologisch wichtigste Klasse der gepaarten Glukuronsäuren eine quantitative Bestimmungsmethode von hinreichender Genauigkeit gegeben.

Um die in den gepaarten Glukuronsäuren vorhandene Glukuronsäure in die für die quantitative Bestimmung geeignete d-Zuckersäure überzuführen, muß, wie früher auseinandergesetzt worden ist, ihre Abspaltung und Oxydation gleichzeitig erfolgen. Die praktische Ausführung dieses Prinzips gestaltet sich folgendermaßen:

1,35 g Phenolglukuronsäure werden in einem Einschlußrohr mit 50 cem 3%iger Bromwasserstoffsäure übergossen und nach Zusatz von 2 cem Brom drei Stunden lang im siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Öffnen des völlig erkalteten Rohres wird der Inhalt in eine Porzellanschale entleert und die durch Nachwaschen auf ca. 100–120 cem angewachsene Lösung auf dem Wasserbade vom Brom befreit, wobei man gleichzeitig auf etwa 20 cem einengt. Nach Filtration von zum Teil ölig ausgeschiedenen Bromphenolen wird die zuvor abermals, und zwar auf etwa 5 cem, konzentrierte Flüssigkeit mit einer heiß gesättigten Lösung von Barytwasser bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt und wiederum auf ca. 20 cem eingedampft. Die flockige, leicht filtrierbare Ausscheidung von basischem zuckersauren Baryt wird sodann durch ein kleines Filter abfiltriert und mit gesättigtem Baryt-

¹⁾ Vergl. Neuberg u. Mayer, Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 256.

wasser bis zum Verschwinden der Halogenreaktion ausgewaschen. Nun durchstößt man das Filter, spritzt den Niederschlag in ein Kölbchen und kocht ihn einige Zeit mit einer gesättigten Lösung von Ammonkarbonat unter Zusatz von etwas Ammoniak. Nach etwa einhalbstündigem Erwärmen filtriert man vom Baryumkarbonat ab und verdunstet das Filtrat in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade. Den restierenden Sirup nimmt man mit Wasser auf und dampft dieses noch einmal ab, wonach in der Regel die flüchtigen Ammonverbindungen bereits entfernt sind. Die auf etwa 3—5 ccm eingeeengte Flüssigkeit wird sodann mit konzentrierter Silbernitratlösung gefällt und nach öfterem Durchrühren sowie zweistündigem Stehen im Dunkeln in einem gewogenen Goochtiiegel abfiltriert, wobei man zur Vermeidung von Verlusten zunächst die Mutterlauge zum Nachspülen verwendet und schließlich mit 50%igem, dann mit 96%igem Alkohol auswäscht: das ausgeschiedene Silbersalz wird im Vacuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei richtig geleiteter Operation muß es rein weiß sein oder darf höchstens einen schwach violetten Schimmer besitzen. So wurden 1.9952 g zuckersaures Silber isoliert, was einer Ausbeute von 94—95% entspricht.

Ein weniger günstiges Resultat lieferte die Anwendung desselben Verfahrens auf die Euxanthinsäure. Zunächst muß man hier die Menge des Broms erhöhen, da durch Bromierung des Euxanthourestes nicht Halogen genug zur Oxydation der abgespaltenen Glukuronsäure vorhanden ist. Die im übrigen gleich behandelte, von den schön kanariengelb gefärbten Bromsubstitutionsprodukten des Euxanthons abfiltrierte Flüssigkeit ergab bei den verschiedenen Versuchen nur 60—70% der theoretischen Menge an zuckersaurem Silber.

Bei Anwendung desselben Verfahrens auf Urochloral-säure (in Form des Natriumsalzes) wurden unerklärlicherweise überhaupt nur geringe Mengen des Baryumsalzes und nur Spuren der Silberverbindungen erhalten.

War somit für die gepaarten Glukuronsäuren der Phenolreihe die prinzipielle Brauchbarkeit der Methode ermittelt, so handelte es sich nun darum, die gewonnenen Erfahrungen für

die Harnanalyse nutzbar zu machen, da hier die Gegenwart zahlreicher Substanzen, wie z. B. von Phosphaten und Sulfaten, störend wirkt.

Von den verschiedenen Methoden, welche sich für die Entfernung der gedachten störenden Substanzen boten, erwies sich schließlich das folgende Verfahren als das geeignetste:

100 ccm normaler Harn, in welchem 0,8 g Phenolglukuronsäure gelöst sind, werden bei Wasserbadtemperatur mit gesättigtem Barytwasser bis zur Ausfällung versetzt, filtriert und durch Einleiten von Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit. Das Filtrat dampft man, unbekümmert um etwa spätere Ausscheidungen, auf dem Wasserbade auf etwa 5—8 ccm ein und füllt den noch warmen Rückstand, bevor Kristallisation erfolgt, durch einen Trichter mit langem Ansatz in ein weites Schießrohr ein, wobei man zum Nachspülen gleich die erforderlichen 50 ccm Bromwasserstoffsäure von 3% verwendet. Nach völligem Erkalten füllt man durch den Trichter, der natürlich nicht in die Flüssigkeit eintauchen darf, 2 ccm Brom ein und schmilzt das Rohr zu. Das Erhitzen und die weitere Behandlung erfolgt dann in der zuvor angegebenen Weise. Nach der Spaltung findet man auf dem Boden des Rohres fast stets einen Niederschlag von Baryumsulfat, welches durch Einwirkung gelöster Baryumsalze auf die in Freiheit gesetzte Schwefelsäure der Äthersulfate entstanden ist; das abgespaltene Phenol ist fast niemals als kristallisiertes Tribromphenol, sondern in Form von perbromierten öligen Verbindungen vorhanden.

Aus der Flüssigkeit, die auf die beschriebene Art weiter behandelt wurde, konnten schließlich 1,2711 g zuckersaures Silber dargestellt werden, d. i. 90% der auf die angewandte Glukuronsäureverbindung berechneten Menge.

Das erhaltene Silbersalz war frei von Harnsäure, die demnach zuvor ausgefällt sein mußte und vermutlich in den mit Ammonkarbonat behandelten Barytsalzen blieb.

Eine genauere Untersuchung erforderte die Frage, ob das Verfahren auch bei Gegenwart von viel ätherschwefelsauren Salzen neben Phenolglukuronsäure anwendbar ist, eine Möglichkeit, die bei Karbolharnen sehr leicht vorliegen kann. In

diesem Falle wird nämlich bei der gleichzeitigen Spaltung und Oxydation der gepaarten Glukuronsäure auch die gepaarte Schwefelsäure zerlegt, und die in der bromwasserstoffsäuren Lösung befindliche Menge von Barytsalzen genügt nicht zur Ausfällung der gebildeten Schwefelsäure. Nimmt man nun deren Entfernung als Baryumsulfat vor, so ist selbst in der Verdünnung eine Mitfällung von zuckersaurem Baryt zu befürchten. Diese kann man zwar vermeiden, indem man durch reichlichen Zusatz von Salz- oder Bromwasserstoffsäure das zuckersaure Salz in Lösung hält; alkalisiert man jedoch nach der Filtration des Baryumsulfats mit Ammoniak oder Baryt, so fällt nunmehr das basische Baryumsaccharat nicht vollständig nieder, da es in größeren Mengen von Baryumchlorid oder-bromidlösung etwas löslich ist oder mit diesen anorganischen Salzen Doppelverbindungen liefert. Es hat sich indessen gezeigt, daß die Gegenwart von viel Äthersulfaten gar keine Abweichung von der zuvor gegebenen Vorschrift nötig macht, da man die in Freiheit gesetzte Schwefelsäure ohne weiteres durch Baryt gemeinsam mit der Zuckersäure fällen kann. Bei der beschriebenen Zerlegung der Barytverbindungen mit Ammonkarbonat wird nämlich kein oder so wenig Ammonsulfat gebildet, daß eine Verunreinigung des zuckersauren Silbers mit schwerlöslichem Silbersulfat nicht zu konstatieren ist.

Diese Feststellungen wurden in der im folgenden beschriebenen Weise an einem Phenolharne vorgenommen; die analytischen Daten seien im einzelnen mitgeteilt, da sie die Brauchbarkeit des Verfahrens selbst in komplizierten, klinisch aber besonders wichtigen Fällen demonstrieren.

Zu den bisherigen Bestimmungen hat synthetische Phenolglukuronsäure gedient, die möglicherweise von der natürlichen verschieden ist. Wenn auch eine solche Differenz, die nur auf Isomerie beruhen könnte, kaum einen merklichen Unterschied im analytischen Verhalten beider Verbindungen bedingen würde, so erschien doch ein Versuch mit dem Naturprodukte wünschenswert. Da kristallisierte natürliche Phenolglukuronsäure nicht zur Verfügung stand, so haben wir uns in folgender Weise geholfen:

An einer Portion Hundeharn, die nach Verfütterung von 10 g Phenol innerhalb von vier Tagen entleert war, wurde zunächst in 100 ccm eine quantitative Phenolbestimmung vorgenommen, und zwar nach der Methode von Neuberg,¹⁾ welche in allen Fällen anzuwenden ist, bei denen der Harn Kohlehydrate — reduzierende Zucker- oder Glukuronsäureverbindungen — enthält.

Die Menge des Phenols betrug in dem ziemlich konzentrierten Harn 0,9808 g für 100 ccm: die Quantität der Ätherschwefelsäure in gleichfalls 100 ccm belief sich, berechnet als SO_3 , auf 0,3282 g.

Diese Menge SO_3 vermag nun 0,3855 g Phenol zu binden.²⁾

Da der untersuchte Harn frei von Indoxyderivaten war, und die etwa normalerweise ausgeschiedene Quantität Kresol gegen die gesteigerte Phenolmenge verschwindet, kann man annehmen, daß der Rest von $(0,9808 - 0,3855 \text{ g} =) 0,5953 \text{ g}$ Phenol an Glukuronsäure geknüpft ist; legt man bei der Berechnung³⁾ für diese Phenolglukuronsäure die Formel der synthetischen Säure $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_7$ zugrunde, so ergibt sich, daß in 100 ccm 1,2285 g Glukuronsäure in gebundener Form vorhanden sein müssen.

Die quantitative Glukuronsäurebestimmung wurde nur an 50 ccm dieses Harns vorgenommen: gefunden wurden 1,2153 g d-zuckersaures Silber. Daraus ergibt sich die Menge der Glukuronsäure in 100 ccm zu 1,1121 g, d. h. in ausreichender Übereinstimmung mit dem berechneten Werte.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 123 (1899).

²⁾ $\text{SO}_3 + \text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{OH} = \text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{O} \cdot \text{SO}_3\text{H}$, d. h. 80 g SO_3 entsprechen 94 g Phenol.

³⁾ $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{OH} + \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 = \text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_9(\text{C}_6\text{H}_5)\text{O}_7$, d. h. 94 g Phenol binden 194 g Glukuronsäure