

Zur Methodik der Phenolbestimmung im Harn.

Von
Marie Hensel.

(Aus dem Universitätslaboratorium für medizinische Chemie und experimentelle
Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1912.)

In der Methodik der Phenolbestimmung im Harn herrscht zurzeit eine bedauerliche Unsicherheit. Das gilt besonders von der Bestimmung der Phenole in Harnen, die reich an Zucker oder gepaarten Glykuronsäuren sind. Neuberg¹⁾ hat zwar bereits im Jahre 1899 ein Verfahren angegeben, nach dem es gelingen sollte, die Phenole von den bei der Destillation mit Schwefelsäure aus Kohlenhydraten entstehenden flüchtigen aldehyd- und ketonartigen Produkten zu trennen. Aber wie Neuberg selbst in seinem jüngst erschienenen Handbuch S. 478 schreibt, hat es sich gezeigt, daß «bei Anwesenheit von sehr viel Zucker und Glykuronsäure die Entfernung der die Phenole begleitenden jodbindenden Stoffe Schwierigkeiten bereitet», und daß «für diese Fälle geeignete Methoden fehlen». Im hiesigen pharmakologischen Institut sind schon vor einigen Jahren Beobachtungen bei Phenolbestimmungen gemacht worden, wonach das Neubergsche Trennungsverfahren versagte.

Inzwischen veröffentlichte Mooser²⁾ im Jahre 1909 eine gegenüber dem Kossler-Pennyschen Verfahren in mehreren Punkten modifizierte Methode, die nach den angeführten Kontrollbestimmungen in dem an Glykuronsäure reichen Rinderharn

¹⁾ C. Neuberg, Über die quantitative Bestimmung d. Phenols im Harn. Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 123, 1899.

²⁾ W. Mooser, Beiträge zur Kenntnis der aromatischen Körper des Harns. Dissertation, Basel 1908. Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 155, 1908.

gute Werte gab. Das Vertrauen zu dieser Methode mußte aber durch die von Neuberg und Hildesheimer¹⁾ dagegen erhobenen, auf Versuche gestützten Einwände erschüttert werden.

Aus dieser Sachlage ergab sich die Notwendigkeit, um ein zuverlässiges Verfahren empfehlen zu können, sowohl die Moosersche Methode wie die dagegen ins Feld geführten Versuche nachzuprüfen. Auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Professor Ellinger habe ich eine solche Nachprüfung ausgeführt und gleichzeitig eine andere Methode der Phenolbestimmung ausgearbeitet. Sie stützt sich auf die bekannte Eigenschaft der Phenole, daß sie aus saurer Lösung in Äther übergehen und der ätherischen Lösung nicht durch Natriumbicarbonat, wohl aber durch Natronlauge entzogen werden.

Das Verfahren, das bei der Darstellung der Phenole von jeher gute Dienste geleistet hat, ist, wie die folgenden Versuche zeigen, für quantitative Bestimmungen wohl verwertbar. Wenn es auch hinsichtlich der Bequemlichkeit und Schnelligkeit der Ausführung vielleicht keine großen Vorzüge gegenüber dem Mooserschen Verfahren bietet, so gewährt es doch die Möglichkeit, dieses zu kontrollieren, und der Vergleich hat gezeigt, daß die Bestimmung nach Mooser zuverlässig ist und die dagegen erhobenen Einwände nicht gerechtfertigt sind.

I. Beschreibung der Ausschüttelungsmethode.

500 ccm Harn werden schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade auf ungefähr 100 ccm abgedampft, in den Destillationskolben gespült (mit Spülwasser ungefähr 150—200 ccm) und 25 ccm sirupöse Phosphorsäure dazu gebracht (spez. Gew. 1,7 entspr. 84,7% H_3PO_4). Am absteigenden Kühler wird abdestilliert bis auf 100 ccm, jeweils 50 ccm H_2O nachgefüllt und so oft destilliert, bis die Millonsche Probe negativ ausfällt. Die Zahl der notwendigen Destillationen ist sehr verschieden (6—20). Soweit also wird genau nach Moosers Vorschrift verfahren. Das Destillat wird 4mal mit etwa $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$ seines Volumens

¹⁾ Neuberg u. Hildesheimer, Die Bestimmung der Phenole im Rinderharn. Biochem. Zeitschr., Bd. 28, S. 525, 1910.

gereinigten Äthers¹⁾ ausgeschüttelt, die Ätherlösung sodann erst 4 mal mit 4%iger NaHCO_3 -Lösung und schließlich 4 mal mit annähernd $\frac{1}{10}$ -NaOH-Lösung. Die NaOH wird in der phenolhaltigen alkalischen Lösung soweit neutralisiert, daß ihre Alkaleszenz 20 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH entspricht. Waren z. B. 250 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH verbraucht, so wurden 248 $\frac{1}{10}$ - H_2SO_4 zugegesetzt. In der alkalischen Lösung werden durch Titration nach Kossler und Penny die Phenole bestimmt.

Bezüglich der Verwertbarkeit von Millons Reagens wurden folgende Versuche angestellt. Die Empfindlichkeit des nach der Vorschrift in Salkowskis Praktikum bereiteten Reagens war für reines Phenol 11 : 1 000 000, für reines Kresol 2 : 1 000 000 und für ein Gemisch von zwei Teilen Kresol und einem Teile Phenol 6,5 : 1 000 000. Danach kann in 50 ccm Destillat noch gerade nachgewiesen werden 0,00056 g Phenol, 0,0001 g Kresol und von dem Gemisch 0,000325 g. Das sind Mengen, die ungefähr 0,2—0,3 ccm Jodlösung erfordern, und es war deshalb nicht ausgeschlossen, daß durch Summation in den verschiedenen Destillaten der Titrationsfehler eine beträchtliche Größe erreichte. Mooser behauptet, daß, wenn er nach Versagen der Millonschen Reaktion noch einige Stunden weiterdestilliert, im Destillat höchstens 0,3 ccm Jodlösung verbraucht wurden. Diese Angabe wurde nachgeprüft und bestätigt gefunden. Es ergibt sich also, daß, wie Mooser und neuerdings auch Neuberg angeben, Millons Reagens wohl geeignet ist, die Grenze der Destillation anzugeben.

II. Die Prüfung der Ausschüttelungsmethode.

a) An reinen Phenollösungen.

30 ccm einer Lösung von 2 Teilen Kresol und 1 Teil Phenol, die im ganzen 7,7 ccm Jodlösung verbrauchten, wurden 6 mal²⁾ mit Äther ausgeschüttelt, und der Rest titriert. Es ergab sich, daß alle Phenole in den Äther gegangen waren. Die Ätherlösung wurde 3 mal mit NaHCO_3 (5% iger Lösung) ausgeschüttelt und die NaHCO_3 -Lösung titriert. In NaHCO_3 waren keine Phenole übergegangen. Die Ätherlösung wurde mit NaOH ausgeschüttelt und die NaOH-Lösung titriert. In dem ersten Versuch wurden 7,55 ccm Jodlösung verbraucht, im zweiten 7,6 ccm.

¹⁾ Der Äther wird zur Reinigung 5 mal mit NaOH ausgeschüttelt. Die 5. Ausschüttelung mit NaOH enthält keine jodbindenden Substanzen mehr.

²⁾ Wie sich später zeigte, genügen 4 Ätherausschüttelungen; die fünfte war in 4 Versuchen frei von jodbindenden Substanzen.

b) An Harn durch Vergleichsbestimmungen.

Es wurden in 3 Kontrollbestimmungen an demselben Harn folgende Werte erhalten:

1. Verbrauch von 8,35 ccm Jodlösung
2. » » 8,3 » »
3. » » 8,25 » »

Von einem der Harnen wurden die NaHCO_3 -Ausschüttelungen untersucht, es ergab sich ein Verbrauch von 1,2 ccm Jodlösung. Daraus erhellt, daß tatsächlich jodbindende Substanzen, die nicht Phenole sind, in NaHCO_3 übergehen.

c) An Harn mit Zusatz von Phenollösungen.

250 ccm Harn verbrauchten 9,15 ccm Jodlösung; nach Zusatz von 25 ccm eines Gemisches von 2 Teilen Kresol und 1 Teil Phenol, das 6,2 ccm Jodlösung verbrauchte, zeigten 250 ccm desselben Harnes einen Jodverbrauch von 15,15 ccm.

III. Vergleich der Methode von Mooser mit der Ausschüttelungsmethode.

a) An normalem Harn.

1000 ccm Harn wurden nach der üblichen Vorbehandlung über H_3PO_4 destilliert und das Destillat in 2 Teile geteilt; ein Teil wurde nach Mooser, ein Teil nach der Ausschüttelungsmethode untersucht. Von demselben Harn wurden 3 Bestimmungen nebeneinander gemacht. Nach Mooser ergab Analyse 1 den Verbrauch von 32,15 ccm Jodlösung, Analyse 2 32,4 ccm und Analyse 3 32,1 ccm Jodlösung, im Mittel **32,22** ccm Jodlösung.

Nach der Ausschüttelungsmethode ergab

Analyse 1 den Verbrauch von 32,05 ccm Jodlösung

» 2 » » » 32,3 » »

» 3 » » » 32,2 » »

im Mittel **32,18** ccm Jodlösung.

Ein anderer Harn ergab nach Mooser den Verbrauch von 18,55 ccm Jodlösung, nach der Ausschüttelungsmethode 18,25 ccm Jodlösung, und ein dritter Harn zeigte nach Mooser den Verbrauch von 20,6 ccm Jodlösung, nach der Ausschüttelungsmethode 20,15 ccm Jodlösung.

stets 50 ccm H₂O nachgefüllt. Versuch 2 wurde 3 mal ausgeführt. Das Destillat reduzierte in keinem der Versuche ammoniakalisch alkalische Silberlösung.

100 ccm des Destillates verbrauchten
 im Versuch 1 0,0 ccm Jodlösung
 2 0,2
 3 0,1

Der Übergang jodbindender Substanzen in das Destillat in Versuch 2 findet seine Erklärung darin, daß versehentlich die Konzentration der Säure bei der Destillation zu groß geworden war, was sich durch intensive Dunkelfärbung der Lösung äußerlich kenntlich machte.

Bei Nachprüfung von Versuch 1 von Neuberg wurden im Destillat keine jodbindenden Substanzen durch Titration gefunden. Mit Anilin konnte nur eine schwache Spur Furfurol nachgewiesen werden (Empfindlichkeit dieser Probe 4 : 1 000 000) und mit Phloroglucid und Salzsäure ergeben sich in 200 ccm Destillat nicht wägbare Mengen von Furfurolphloroglucid. Eine zweite Destillation bestätigte nur die Resultate der ersten.

0,4 g Furfurol erfordern, wie die Titration von 40 ccm 1%iger Furfurollösung¹⁾ ergab, 3,4 ccm Jodlösung. 0,1 ccm Jodlösung würde demnach $0,4/34 = 0,01$ g Furfurol entsprechen. Eine solche Menge läge etwa in der Grenze der Nachweisbarkeit; die von Neuberg ermittelte Furfurolmenge von ungefähr 0,1147 g (nach Kröbers Tabelle²⁾) müßte sich auch titrimetrisch nachweisen lassen. In meinem Versuche waren überhaupt keine jodbindenden Substanzen nachweisbar.

Dieselbe Lösung der l-Arabinose wurde nach Zusatz von 5 ccm konzentrierter H₂SO₄ unter ständiger Erneuerung des H₂O destilliert, bis 500 ccm übergegangen waren. 100 ccm des

¹⁾ Bei dieser Gelegenheit wurde das Verhalten von Furfurol zu Äther, NaHCO₃ u. NaOH untersucht. Es ergab sich, daß Furfurol nur wenig schwerer als Phenol und Kresol in Äther übergeht. Aus der Ätherlösung geht nichts in NaHCO₃, alles in NaOH. Es ist also durch die Ausschüttelungsmethode nicht möglich, das Furfurol von den Phenolen zu trennen.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 36, I, 1912.

Destillates verbrauchten 0,3 ccm Jodlösung. Mit Phloroglucin in Salzsäure ergab sich ein starker Niederschlag von Furfurol-phloroglucid.

Die übrigen von Neuberg¹⁾ und Hildesheimer angeführten Versuche wurden nicht nachgeprüft, da die Mengen Furfurol, die dabei gefunden wurden, mit Jodlösung kaum nachzuweisen wären.

Nach den bisher angeführten Tatsachen scheint es sicher, daß, wie Mooser behauptet, bei Anwendung von H_3PO_4 keine jodbindenden Substanzen übergehen. Das zeigen auch folgende Versuche:

1. 1000 ccm 10%iger Traubenzuckerlösung + 50 ccm konzentrierter H_2SO_4 wurden am absteigenden Kühler bis 200 ccm abdestilliert, je 100 ccm H_2O nachgefüllt, bis das Destillat 1 l betrug. 200 ccm des Destillates verbrauchten 7,5 ccm Jodlösung, und nach Destillation über $CaCO_3$ im Kohlensäurestrom (6 mal) verbrauchten andere 200 ccm des Destillates noch 0,7 ccm Jodlösung.

2. 1000 ccm 10%iger Traubenzuckerlösung + 50 ccm H_3PO_4 wurden ebenso destilliert. Nach Behandlung mit $CaCO_3$ im Kohlensäurestrom waren 200 ccm des Destillates frei von jodbindenden Substanzen.

b) Verhalten von reinen Phenollösungen bei Gegenwart von Traubenzucker.

Es wurde wieder mit einem Gemisch von 2 Teilen Kresol und einem Teil Phenol gearbeitet. 30 ccm des Gemisches verbrauchten 7,4 ccm Jodlösung. 75 ccm des Gemisches würden dann 18,5 ccm Jodlösung verbrauchen. (Fehlergrenze 18,25 bis 18,75.)

150 ccm dieses Gemisches wurden ohne Zusatz von Traubenzucker über H_3PO_4 destilliert. Vom Destillat wurde die Hälfte nach Mooser, die andere Hälfte nach der Ausschüttelungsmethode untersucht.

¹⁾ Neuberg u. Hildesheimer, Biochem. Zeitschr., Bd. 28, S. 525, 1910.

Nach Mooser wurden 18,45, nach der Ausschüttelungs-
methode 18,3 ccm Jodlösung verbraucht.

Derselbe Versuch nach Zusatz von 95 ccm 6 $\frac{1}{2}$ %iger
Traubenzuckerlösung ergab im Destillat nach Mooser den
Verbrauch von 18,0 ccm Jodlösung, nach der Ausschüttelungs-
methode 18,4 ccm Jodlösung.

c) Verhalten von Harn nach Zusatz von Traubenzucker.

1. Bei Anwendung der Mooserschen und der
Ausschüttelungsmethode.

Von 2000 ccm Harn wurden 1000 ohne, 1000 mit Trauben-
zuckerzusatz (4 $\frac{1}{2}$ %) nach Mooser und nach der Ausschüttele-
lungsmethode behandelt.

Die Werte waren nach Mooser

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| 1. ohne Traubenzucker | 21,7 ccm Jodlösung |
| 2. mit | 21,1 » » |

und nach der Ausschüttelungsmethode

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| 1. ohne Traubenzucker | 21,4 ccm Jodlösung |
| 2. mit | 21,8 » » |

Ein anderer Harn, ebenso behandelt, ergab folgende
Resultate:

- | | |
|--------------------------------|--------------------|
| nach Mooser ohne Traubenzucker | 27,3 ccm Jodlösung |
| mit | 27,3 » » |

nach der Ausschüttelungsmethode

- | | |
|--------------------|---------------------|
| ohne Traubenzucker | 26,75 ccm Jodlösung |
| mit | 26,8 » » |

2. Bei Anwendung der Neubergschen Modifikation.

Von 2000 ccm Harn (6 $\frac{1}{2}$ % Traubenzucker) wurden
1000 über H₃PO₄ und 1000 ccm über H₂SO₄ nach Neuberg
destilliert.

Das Destillat über H₃PO₄ wurde zur Hälfte nach Mooser
und zur Hälfte nach der Ausschüttelungsmethode behandelt.

Nach Mooser ergab sich ein Verbrauch von 26,6 ccm
Jodlösung; nach der Ausschüttelungsmethode 27,2 ccm. Das
Destillat über H₂SO₄ wurde zur Hälfte nach den Angaben von
Neuberg weiter behandelt, d. h. erst über CaCO₃ destilliert,

dann zum Vertreiben der aldehyd- und ketonartigen Substanzen mit Ätznatron und Bleizucker versetzt, tüchtig geschüttelt und $\frac{1}{4}$ Stunde auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wurde noch 10 Minuten auf freier Flamme am absteigenden Kühler erhitzt, da erst nach diesen 10 Minuten das Destillat nicht mehr ammoniakalisch alkalische Silberlösung reduzierte. Hierauf wurde mit H_2SO_4 angesäuert und wieder destilliert. Das Destillat titriert ergab den Verbrauch von 12,1 ccm Jodlösung.

Die andere Hälfte des Destillates wurde nach der Ausschüttelungsmethode weiter behandelt. Der Verbrauch von Jodlösung betrug 28,15 ccm, während im Destillat über H_3PO_4 höchstens 27,2 verbraucht waren. Der geringe Überschuß ist wohl zum größten Teil auf Furfurol zurückzuführen. Es wurde im Destillate nachgewiesen.

Aus diesen Angaben folgt, daß es nicht möglich ist, wie ja auch Neuberg neuerdings selbst angibt, bei stark zuckerhaltigen Harnen die nach Destillation mit H_2SO_4 auftretenden aldehyd- und ketonartigen Substanzen zu entfernen, ohne daß zugleich ein Teil der im Harn enthaltenen Phenole mit hinausgeht.

Zusammenfassung.

1. Das beschriebene Ausschüttelungsverfahren zur Bestimmung der Phenole im Harn liefert zuverlässige Resultate auch in kohlenhydratreichen Harnen.

2. Das Moosersche Verfahren der Phenolbestimmung im Harn gibt ebenfalls exakte Werte. Die gegen dieses Verfahren von Neuberg und Hildesheimer erhobenen Einwände sind unberechtigt.