

Über den Nachweis kleiner Zuckermengen durch Formaldehydbildung und die formaldehydbildenden Substanzen des Harns.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1915.)

Vor kurzer Zeit hat L. Rosenthaler¹⁾ und unabhängig von ihm auch ich²⁾ gefunden, daß Kohlenhydrate bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung Formaldehyd geben. Da Formaldehyd durch äußerst feine und farbenprächtige Reaktionen ausgezeichnet ist, lag der Gedanke nahe, dieses Verhalten zum Nachweis kleiner Zuckermengen im Harn zu verwenden, deren Feststellung auf einfachem Wege nicht leicht gelingt. Wenn die Versuche hierüber auch nicht zu einem in vollem Umfange befriedigenden Resultat geführt haben, so halte ich doch die Mitteilung derselben nicht für überflüssig.

Zur Feststellung des Formaldehyds bediente ich mich bei den Versuchen über diese Frage vorwiegend einer von mir aufgefundenen Modifikation der Probe von Leach.³⁾ Diese Modifikation habe ich in einer Mitteilung über einige Formaldehydreaktionen in der Biochemischen Zeitschrift (Bd. 68, S. 377) beschrieben. Um dem Leser die Mühe des Nachschlagens zu ersparen, sei es mir gestattet, diese Reaktion kurz anzuführen.

Versetzt man eine Formaldehydlösung von der Konzentration 1 : 50000 (3,5 g Formalin auf 1000, 50fach verdünnt) mit einer Messerspitze oder Spatelspitze Pepton «Witte», löst

¹⁾ Rosenthaler, Arch. d. Pharmacie. Bd. 251, S. 587 (1914).

²⁾ E. Salkowski, Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungsmittel usw., Bd. 28, S. 225 (1914).

³⁾ Dieselbe wird in ihrer ursprünglichen Form mit Milch angestellt.

dasselbe unter Umschütteln und Erwärmen, setzt 3 Tropfen 3%iger Eisenchloridlösung hinzu, alsdann etwa das halbe Volumen Salzsäure von 1,19 D und erhitzt zum Sieden, so nimmt die bis dahin gelbe Flüssigkeit, eine violette Färbung an, die sich bald zu einer blauvioletten, schließlich tiefblauen Färbung verstärkt. Die Reaktion gehört zu den feinsten und schönsten in der physiologischen Chemie und ist im Gegensatz zu den anderen Reaktionen des Formaldehyds, welche alle vergänglich sind, monatelang, anscheinend unbegrenzt haltbar.

Zu den Versuchen über die Nachweisbarkeit des Traubenzuckers durch diese Oxydation benutzte ich eine Lösung, die aus 30 ccm verdünnter Schwefelsäure (200 g aufgefüllt zu einem Liter), 20 ccm 1%iger Kaliumpermanganatlösung und 50 ccm Wasser zusammengesetzt war. Die Lösung muß öfters erneuert werden, da sich ihr Wirkungswert durch Ausscheidung von Mangansuperoxyd verringert, indessen ist eine geringe Ausscheidung für die Anwendbarkeit ohne Bedeutung. Die Ausscheidung von Mangansuperoxyd beruht natürlich auf einer Zersetzung der Übermangansäure unter Abspaltung von Sauerstoff. Bei der angegebenen Konzentration und öfterem Öffnen der Flasche zum Gebrauch der Lösung ist die Sauerstoffabgabe nicht bemerkbar, wohl aber dokumentiert sie sich; wenn man zur Herstellung der Oxydationsmischung statt 1%iger Lösung von KMnO_4 eine 5%ige anwendet — was unter Umständen vorzuziehen ist — und die Flasche verschlossen hält, durch den nach einigen Tagen oder einer Woche entstehenden Überdruck, der sich beim Öffnen der Flasche bemerkbar macht. Dieselbe darf also nur lose verschlossen werden, besser ist es jedoch, eine solche konzentriertere Lösung nicht vorrätig zu halten, da sich ihr Wirkungswert doch zu schnell ändert.

Zur Prüfung der Feinheit der Reaktion diene zunächst eine Traubenzuckerlösung von 1‰ (Traubenzucker «Kahlbaum») 2 ccm dieser Lösung¹⁾ wurden mit 5 ccm der obigen Oxydationsmischung bis zur beginnenden Trübung und Ausscheidung von Mangansuperoxyd erhitzt, der Überschuß von Mangansuperoxyd durch Zusatz einiger Tropfen Oxalsäurelösung

¹⁾ Warum ich so kleine Mengen anwandte, wird sich später zeigen.

entfernt: man erhält eine farblose, wasserklare Lösung. Behandelt man diese so, wie oben für die Formaldehydlösung 1 : 50000 angegeben, so erhält man eine schöne, positive Reaktion. Verdünnt man die Zuckerlösung auf das 5fache, also 1 : 5000, so fällt die Reaktion negativ aus, dagegen ist sie positiv, wenn man statt 5 ccm der Oxydationslösung nur 2 bis 2 1/2 anwendet. Diese Erscheinung erklärt sich sehr einfach durch die Tatsache, daß der Formaldehyd ja nur ein intermediäres Produkt ist, das durch einen Überschuß des Oxydationsmittels zu Ameisensäure und schließlich zu Kohlensäure oxydiert wird. Praktisch kommt diese Schwierigkeit, wie sich im weiteren Verlauf zeigen wird, nicht in Betracht, für den Harn handelt es sich ja auch nicht um so minimale Mengen. Es empfiehlt sich übrigens auch, den Zusatz von Eisenchlorid bei so kleinen Mengen auf 1 Tropfen zu beschränken, wenigstens in einer Probe, und stets mehrere Proben anzustellen. Bei Anwendung von 2 ccm der Zuckerlösung 1 : 5000 = 0,2 mg ist übrigens die Grenze der Nachweisbarkeit erreicht. Natürlich fällt die Reaktion positiv aus, wenn man 5 ccm dieser Zuckerlösung verwendet.

Es fragte sich nun zunächst, wie sich normaler Harn verhält. Da zeigte sich nun, daß 2 ccm Harn in der angegebenen Weise behandelt eine enorme Reaktion geben. Dasselbe war der Fall, als der Harn vorher durch Schütteln mit Blutkohle (mit Säure gereinigt von Kahlbaum oder Merck) entfärbt war. Ebenso verliefen alle Versuche, die formaldehydbildende Substanz durch Fällungsmittel zu entfernen, resultatlos. Es blieb also nichts anderes übrig, als den Zucker vor Anstellung der Probe einigermaßen zu isolieren. Für diesen Zweck versuchte ich zunächst das Brückesche Verfahren der Fällung mit Bleiessig + Ammoniak, wenn der Zucker dabei auch, wie bekannt, nicht vollständig erhalten wird.

1 l normaler goldgelb gefärbter Harn von 1018 D wurde mit Bleiessig völlig ausgefällt, filtriert, einmal nachgewaschen, das erste Waschwasser zum Filtrat genommen, dann der Niederschlag unter wiederholtem Abnehmen vom Filter so lange gewaschen, bis die Reaktion von 5 ccm des Waschwassers

mit 5 ccm Oxydationsmischung negativ ausfiel.¹⁾ Das ganz schwach gefärbte Filtrat + dem ersten Waschwasser wurde mit Ammoniak alkalisiert, noch etwas Bleiessig hinzugesetzt, nach einigem Stehen filtriert, der Niederschlag völlig ausgewaschen, bis das Waschwasser mit Liebigscher Quecksilberlösung kaum noch eine Trübung zeigte. Alle Filtrate resp. Waschwässer von diesem Niederschlag wurden gesammelt.

I. Der Bleiessigniederschlag

wurde zuerst bei Zimmertemperatur mit schwacher Ammoniumcarbonatlösung behandelt, wobei der Farbstoff z. T. in Lösung ging,²⁾ der Rückstand ausgewaschen. Es zeigte sich, daß diese Behandlung lange nicht allen Farbstoff ausgezogen hatte. Deshalb wurde nun auf dem Wasserbad extrahiert und zwar dreimal hintereinander, jedesmal 1 Stunde lang, da die Ammoniumcarbonatlösung sich immer wieder gelb färbte. Erst der vierte Auszug zeigte keine merkliche Färbung mehr, 5 ccm desselben mit 5 ccm Oxydationsmischung behandelt, gaben keine Reaktion mehr. Ich bemerke noch, daß nach jeder Behandlung mit Ammoniumcarbonat der Niederschlag vollständig mit Wasser ausgewaschen wurde, um sicher zu sein, daß die nächstfolgende Extraktion auch wirklich noch eine Zersetzung herbeiführte und nicht bloß als Waschwasser wirkte. (Auch die Anwendung stärkerer Ammoncarbonatlösung, die wegen des starken Schäumens lästig ist, änderte nicht viel an der Langsamkeit der Einwirkung.) Die Auszüge wurden gesammelt und auf 200 ccm eingedampft.

¹⁾ Dabei muß ich bemerken, daß die Erscheinungen nicht ganz konstant sind: mitunter gibt sogar das Filtrat vom Bleiessigniederschlag selbst nur eine mäßige Reaktion, auch wenn der angewandte Harn sauer reagierte: woran das liegt, habe ich nicht feststellen können.

²⁾ Diese schonende Behandlung habe ich gewählt, weil ich gleichzeitig den Harnfarbstoff weiter zu untersuchen gedachte. Diese Absicht mußte aufgegeben werden, weil die Auszüge zwar fast, aber nicht völlig bleifrei waren, und bei der Behandlung mit Schwefelwasserstoff das Bleisulfid kolloidal blieb, außerdem aber unter Ausscheidung von Schwefel Entfärbung (Reduktion?) eintrat.

1. 2 ccm der Lösung mit 5 ccm Oxydationsmischung: starke Reaktion, jedoch lange nicht so stark, wie bei dem angewendeten Harn selbst.

2. Die Lösung vorher durch Schütteln mit Kohle entfärbt. 2 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung: intensive Reaktion, weit stärker als vor der Entfärbung, fast so stark wie bei dem genuinen entfärbten Harn.

3. Ein Teil der Lösung 5fach, also auf das ursprüngliche Harnvolum, verdünnt. 2 ccm mit 5 ccm der Oxydationsmischung: positive Reaktion und zwar stärker als bei 1.

Daraus geht hervor, daß der Bleiessigniederschlag formaldehydbildende Substanz enthält, die in den Ammoncarbonatauszug übergeht, und daß diese nicht der Harnfarbstoff ist. Da die Entfernung desselben befördernd auf die Reaktion wirkt, so folgt daraus, daß er die Reaktion stört, augenscheinlich, weil er einen Teil der Oxydationsmischung für sich in Beschlag nimmt, ohne Formaldehydbildung. Die paradoxe Erscheinung, daß die 5fach verdünnte Lösung mehr Formaldehyd liefert als die ursprüngliche, erklärt sich auf die gleiche Weise.

Um zu sehen, ob alle formaldehydbildende Substanz in den Ammoniumcarbonatniederschlag übergegangen ist, wurde der rückständige Niederschlag mit ca. 100 ccm 30%iger Essigsäure erhitzt. Dies geschah anfangs im Kolben, dann des zu starken Schäumens wegen in einer Abdampfschale. Filtrat und Washwasser wurden durch H_2S entbleit, vom Schwefelblei abfiltriert, das Filtrat auf 200 ccm gebracht.

1. 2 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung: negativ,

2. 2 » » 2 » 1) Andeutung einer Reaktion,

3. 5 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung: fast ganz negativ.

Daraus folgt, daß die formaldehydbildende Substanz oder das Substanzgemisch so gut wie vollständig in die Ammoncarbonatlösung übergegangen ist.

1) 3 und 1 Tropfen Eisenchloridlösung.

II. Bleiessigammoniakniederschlag.

Derselbe wurde in Wasser suspendiert und mit H_2S zersetzt, was ziemlich lange dauerte. Filtrat und Waschwasser auf 200 ccm.

2 ccm + 5 ccm Oxydationsmischung: mittelstarke Reaktion. Die fünffach, also auf die Konzentration des angewandten Harns, verdünnte Lösung gab sowohl mit 5 als auch mit 2 ccm Oxydationsmischung nur schwache Reaktion.

Daraus folgt, daß die formaldehydbildenden Substanzen durch Bleiessig nicht vollständig gefällt werden, sondern auch — indessen, wie sich zeigen wird, nur sehr unvollständig — in den Bleiessigammoniakniederschlag übergehen.

5 ccm der Lösung gaben schwache Weylsche Kreatininreaktion, 5 ccm der auf $\frac{1}{5}$ verdünnte Lösung nicht.

Die Veranlassung, die aus dem Bleiessigammoniakniederschlag erhaltene Lösung auf Kreatinin zu prüfen, gab einmal der Umstand, daß bei der Prüfung der in größerer Menge im Harn vorkommenden Körper nur das Kreatinin bei Anwendung kleiner Messerspitzen der Substanz sich als formaldehydbildend ergab, andererseits in der Literatur vorliegende Angaben, daß Kreatinin durch Bleiessig und Ammoniak gefällt werde. Die Angaben hierüber sind allerdings nicht einheitlich.

In der 11. Auflage von Hupperts Harnanalyse heißt es S. 663: «Aus wässerigen Lösungen wie aus Harn wird es (nämlich das Kreatinin) nach Colls vollständig gefällt durch Bleiessig und Ammoniak, dagegen nach Albanese nicht.»

Die Angaben von Colls sind mir im Original nicht zugänglich; in dem Referat in Malys Jahresbericht für 1896 (Bd. 26) heißt es S. 89:

«Werden 10 ccm einer 2%igen Lösung von Johnsons Harnkreatinins¹⁾ mit 2,5 ccm einer Lösung von gesättigtem

¹⁾ Was — beiläufig bemerkt — das in den Worten von Colls erwähnte «Johnsons Harnkreatinin» betrifft (Malys Jahresber., Bd. 20, S. 68), so geht die allgemeine Ansicht wohl dahin, daß die Angabe Johnsons, das Kreatinin des Harns sei ein anderes als das durch Säurewirkung aus dem Kreatin erhaltene, unrichtig ist.

Bleiäacetat und 2,5 ccm einer Lösung von basischem Bleiäacetat versetzt, filtriert, das Filtrat mit 4 ccm Liquor Ammonii fortior versetzt und wieder filtriert, das Filtrat angesäuert,¹⁾ mit H_2S behandelt und der Schwefelwasserstoff verdampft, so zeigt die restierende Lösung kein Reduktionsvermögen mehr, das Kreatinin befindet sich im Bleiniederschlag.»

Colls scheint demnach das Kreatinin nicht aus dem Bleiniederschlag dargestellt, sondern nur aus dem Ausbleiben der Reduktion von alkalischer Kupferlösung auf die Fällbarkeit des Kreatinins durch Bleiessig geschlossen zu haben. Colls meint, daß die Befunde von Traubenzucker im normalen Harn nach dem Brückeschen Verfahren unrichtig seien, die beobachtete Reduktion von CuO zu Cu_2O vielmehr auf das Kreatinin zu beziehen sei.

Albanese,²⁾ der als Vertreter der Ansicht der Nichtfällbarkeit des Kreatinins zitiert wird, hat sich hierüber nicht direkt ausgesprochen, vielmehr stillschweigend angenommen, daß es nicht fällbar sei, da er aus dem, 29 Tage hindurch gesammelten, Harn eines Hundes von 12 kg nach vorgängiger Fällung mit Bleiessig und Ammoniak durch Fällung mit Phosphorwolframsäure usw. 50,74 g Kreatininchlorzink = 31,5 g Kreatinin, also über 1,08 g Kreatinin pro Tag erhielt. Mit Recht sagt Albanese: «bei einem Hunde von 12 kg darf man diese Quantität als normal³⁾ ansehen», dennoch hat Albanese insofern nicht Recht, als, wie sich oben gezeigt hat, unter Umständen etwas Kreatinin — wenigstens bei menschlichem Harn — durch Bleiessigammoniak gefällt werden kann.

Was die Fällbarkeit wässriger Lösungen betrifft, so habe ich mich überzeugt, daß eine 1%ige Lösung durch Bleiessig und Ammoniak nicht gefällt wird, dabei habe ich es allerdings für überflüssig gehalten, die komplizierte Versuchsanordnung von Colls nachzuahmen. Daß dies trotzdem im Harn mit

¹⁾ Womit, ist nicht gesagt.

²⁾ Albanese, Zeitschr. für exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 35, S. 452 (1895).

³⁾ Jedenfalls nicht als zu klein, eher ist sie meiner Ansicht nach größer als normal.

einem Teil des Kreatinins der Fall ist, kann nicht Wunder nehmen, da die Verhältnisse im Harn die Entstehung eines reichlichen Niederschlages begünstigen, der wohl etwas Kreatinin «mitreißen» kann.

Die Behauptung Colls., daß der ganze Zuckernachweis nach Brücke im normalen Harn durch Kreatinin vorgetäuscht wird, ist sicher nicht richtig, daß aber das Kreatinin an den reduzierenden Eigenschaften der schließlich bei dem Brückeschen Verfahren erhaltenen stark eingeeengten Lösung beteiligt ist, kann wohl nicht in Abrede gestellt werden. Könnte nun auch in unserem Falle das Kreatinin durch seine Formaldehydbildung Traubenzucker vortäuschen? Das ist ganz ausgeschlossen, denn Kreatinin bildet nur sehr wenig Formaldehyd. 2 ccm einer 1%igen Lösung gaben sowohl mit 5 als mit 2 – 2½ ccm Oxydationsmischung eine positive Reaktion,¹⁾ 2 ccm einer 0,1%igen höchstens eine Andeutung einer solchen. Wenn man die aus dem Bleiessigammoniakniederschlag erhaltene Lösung auf das ursprüngliche Harnvolumen bringt, wie ich es getan habe, ist eine Täuschung durch Kreatinin ganz ausgeschlossen.

III. Filtrat und Waschwasser des Bleiessigammoniakniederschlages.

Dem Volumen nach waren dies etwa 4 l. Durch Einleiten von CO₂ und Stehenlassen gelang es, die Lösung fast vollständig von Blei zu befreien, ohne daß es nötig gewesen wäre, H₂S anzuwenden. Die filtrierte Lösung wurde auf 200 ccm eingedampft.²⁾

1. 2 ccm mit 5 ccm Oxydationslösung: starke Reaktion.

2. 2 ccm der auf 1/5 verdünnten Lösung mit 5 ccm Oxydationsmischung: gleichfalls starke Reaktion.

Sehr bemerkenswert ist auch hier das Verhalten zu Kohle. Die durch Schütteln mit Blutkohle entfärbte Lösung zeigte folgendes Verhalten:

¹⁾ Auffallenderweise gibt Kreatin unvergleichlich stärkere Reaktion: 2 ccm einer 1%igen Lösung gaben eine tiefblaue Reaktionsflüssigkeit, 2 ccm einer 0,1%igen noch eine sehr starke.

²⁾ Die Hauptmenge des Kreatinins befindet sich in dieser Flüssigkeit.

1. 2 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung: äußerst intensive Reaktion.

2. 2 ccm der auf das 5fache verdünnten Lösung: gleichfalls sehr starke Reaktion.

Zur Vergleichung wurden die erhaltenen Reaktionen aus der 5fach verdünnten Lösung ohne Behandlung mit Kohle und nach der Behandlung auf 50 ccm verdünnt. Der Unterschied in der Färbung war sehr erheblich. Durch die Behandlung mit Kohle werden also störende Substanzen entfernt, die augenscheinlich einen Teil der Übermangansäure in Beschlag nehmen, ohne Formaldehyd zu liefern.

Zur Prüfung der Frage, ob es möglich sei, kleine Mengen von Zucker im Harn auf diesem Wege nachzuweisen, wurden nun folgende Versuche angestellt.

Es werden zwei Mischungen aus Harn von 1017D angesetzt:

A. 180 ccm Harn + 20 ccm Wasser.

B. 180 ccm Harn + 20 ccm einer 1%igen Traubenzuckerlösung, also 0,2% Zucker. Der Harn reagierte sauer.

Beide Mischungen wurden mit Bleiessig im Überschuß völlig ausgefällt, Filtrat + erstem Waschwasser mit Ammoniak versetzt, der Niederschlag nach halbstündigem Stehen abfiltriert und so lange mit Wasser gewaschen, bis 5 ccm des Waschwassers keine Reaktion mehr auf formaldehydbildende Substanz geben. Die Niederschläge wurden alsdann in 100 ccm heißer Essigsäure von 30% durch Aufgießen gelöst; durch Zurückgießen der ersten Filtrate auf das Filter gelingt es leicht, ein klares Filtrat zu erhalten. Beide Filtrate wurden auf 200 ccm aufgefüllt.

2 ccm von A. gaben mit 5 ccm Oxydationslösung keine Reaktion, 2 ccm von B. eine recht starke.

Ca. 8 ccm von B. gaben mit Natronlauge von 1,34 übersättigt, wobei sich das anfangs ausgeschiedene Bleioxydhydrat wieder löste, abgekühlt, dann mit einigen Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung und etwas Seignettesalzlösung versetzt und erhitzt, zuerst Gelbfärbung, dann Ausscheidung von rotem Kupferoxydul; A. verhielt sich negativ.

Der Versuch wurde mehrmals mit 50 ccm¹⁾ Harn einerseits, 50 ccm 0,2% Traubenzucker enthaltenden andererseits wiederholt, stets mit demselben Ergebnis.

Es ist aber notwendig, sich bei Anstellung der Probe auf 2 ccm zu beschränken; bei Anwendung von 5 ccm erhält man auch bei normalem Harn eine positive Reaktion, vielleicht abhängig von dem normalen Kohlenhydratgehalt des Harns.

Was geringeren Gehalt an Traubenzucker betrifft, so waren die Resultate bei einem Gehalt von 0,1% Traubenzucker nicht mehr ganz sicher, vermutlich deswegen, weil ein Teil des Traubenzuckers doch immer schon durch Bleiessig allein ausgefällt wird.

Fassen wir also das bisher Ermittelte zusammen, so ergibt sich, daß man einen Gehalt an Traubenzucker von 0,2% sicher nachweisen kann, wenn man eine abgemessene Quantität Harn zuerst mit Bleiessig, dann das Filtrat mit Bleiessig + NH_3 ausfällt, den ausgewaschenen Niederschlag in heißer Essigsäure löst, die Lösung auf das Volumen des ursprünglich angewendeten Harns bringt und 2 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung oxydiert, mit dieser Lösung die Reaktion auf Formaldehyd in der beschriebenen Weise anstellt.

Nun läßt sich nicht verkennen, daß dieses Verfahren recht umständlich ist, es fragte sich, ob man es nicht durch ein einfacheres ersetzen kann.

Vor längerer Zeit habe ich gezeigt, daß Traubenzucker unter Umständen durch Kupferhydroxyd vollständig fällbar ist²⁾ und hierauf ein Verfahren zum Nachweis kleiner Mengen von Traubenzucker begründet.

20 ccm Harn werden mit 10 ccm einer Kupferlösung, die 199,52 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ im Liter enthält (1,6 normal) und 17,6 Normalnatronlauge versetzt, gut umgeschüttelt, 20 bis

¹⁾ Bei Anwendung von 50 ccm genügt zum Auswaschen des Bleiessigammoniakniederschlags 2 bis 3maliges Vollgießen des Filters bis zum Rande.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 3, S. 79.

25 Minuten stehen gelassen, 100 ccm Wasser hinzugesetzt, durch ein großes Faltenfilter filtriert, das Filter, sobald die Flüssigkeit ganz abgelaufen ist, ohne nachzuwaschen herausgenommen, auf Filtrierpapier ausgebreitet, um die noch restierende Flüssigkeit zu entfernen, das Filter wieder in den Trichter gebracht, der Niederschlag durch Aufgießen von salzsäurehaltigem Wasser (1 Salzsäure von 1,125 D : 10) gelöst, mit heißem Wasser nachgewaschen, durch H_2S entkuppert, vom Schwefelkupfer abfiltriert, mit Na_2CO_3 genau neutralisiert, auf 20 ccm eingedampft. Bei einem Gehalt des Harns an Traubenzucker = 1‰ gibt die Flüssigkeit beim Erhitzen mit einigen Tropfen frischgemischter Fehlingschen Lösung reichlich Reduktion mit bald schneller, bald langsamer erfolgenden Ausscheidung von Oxydul: normaler Harn gibt nur eine geringe Entfärbung der blauen Flüssigkeit. Ob diese auf dem normalen Zuckergehalt des Harns beruht, oder etwa auf mitgefällter Harnsäure, kann dahingestellt bleiben: jedenfalls ist das Verhalten des Harns mit 1‰ Zucker von dem des normalen durchaus verschieden. Nach Huppert, 10. Auflage, S. 111, gibt auch normaler Harn ein stark reduzierendes harnsäurereiches Filtrat. Demgegenüber muß ich nach meinen jetzigen Nachuntersuchungen bei meinen früheren Angaben bleiben. nur in einer Beziehung zeigte sich eine Differenz, nämlich in Bezug auf die Quantität der anzuwendenden Natronlauge. Es ergab sich, daß bei Anwendung von 17,6 ccm Normalnatronlauge das Filtrat blau oder bläulich gefärbt war, und man nur 17,2 ccm anwenden durfte. Es war also entweder die Kupferlösung etwas zu schwach oder die Natronlauge etwas zu stark. Möglicherweise ist auch die Beschaffenheit des Filtrierpapiers von Einfluß.

Eine Abänderung für den vorliegenden Zweck mußte das beschriebene Verfahren insofern erfahren, als es notwendig war, den Niederschlag gut auszuwaschen. Dies erwies sich bei der schleimigen Beschaffenheit des Niederschlages als äußerst lästig und zeitraubend. Um die Filtration und das Auswaschen zu erleichtern, wurden daher der Mischung 20 ccm 10% iger Chlorbaryumlösung und dann soviel Na_2CO_3 -lösung hinzugesetzt, daß die Mischung deutlich alkalisch reagierte. Die Filtration

ging nun etwas besser, erforderte aber immer noch viel Zeit, und bei Anwendung der Saugpumpe ging leicht etwas Niederschlag durch das Filter. Der Niederschlag wurde in heißer Essigsäure gelöst, nachgewaschen, das Kupfer durch H_2S entfernt, das Filtrat von Schwefelkupfer auf 20 ccm eingedampft.

Über das Ergebnis zahlreicher Versuche kann ich mich kurz fassen: das Verfahren ist unanwendbar, da auch aus normalem Harn formaldehydbildende Substanzen so reichlich in den Kupferniederschlag übergehen, daß eine Unterscheidung von 0.2% Traubenzucker enthaltendem Harn von dem angewendeten genuinen Harn nicht möglich ist. Dabei sehe ich von einzelnen Fällen ab, in denen dies nach starker Verdünnung der Reaktionsmischung durch Farbenvergleichung gelang.

Es bleibt also nur das Bleiverfahren nach Brücke übrig. Angesichts der Umständlichkeit desselben erhebt sich die Frage, inwieweit eine positiv ausfallende Reaktion überhaupt für abnormen Zuckergehalt beweisend ist, und ob die Reduktionsprobe mit der erhaltenen Lösung nicht mehr leistet. Gegen beide Proben ist einzuwenden, daß sie nicht speziell Traubenzucker beweisen, sondern reduzierende Zuckerarten überhaupt, also auch Pentosen, ja auch bei größerem Gehalt an gebundener Glucuronsäure — freie Glucuronsäure kommt wohl nicht vor — positiv ausfallen können. Die Formaldehydprobe würde voraussichtlich auch bei einem Gehalt an löslichen Kohlenhydraten positiv ausfallen,¹⁾ die Reduktionsprobe nicht; allein derartige Kohlenhydrate kommen im Harn wohl nicht pathologisch vermehrt vor. Der Gehalt an Kreatinin, das ja teilweise durch Bleiessig + Ammoniak gefällt wird — wenigstens beim Harn — kann bei der Reduktionsprobe zu Irrtümern Veranlassung geben. Bei der Formaldehydprobe ist diese Gefahr gering, da das Kreatinin relativ wenig Formaldehyd liefert. Bei beiden Proben muß man auf den Gebrauch von Medikamenten Rücksicht nehmen. Der Kreis dieser Substanzen, durch die Traubenzucker vorgetäuscht werden könnte, ist aber wohl bei der

¹⁾ Auch ein rohrzuckerhaltiger Harn gibt positive Reaktion, ein etwaiger Glyceringehalt kommt nicht in Betracht.

Formaldehydprobe etwas größer. Rosenthaler führt l. c. als medikamentöse formaldehydbildende Substanzen an: Kresol, Guajacol, Salicin, Atropin, Chinin, Coffein, Theobromin, Pyramidon. Von einigen dieser ist es bekannt, daß sie dem Harn reduzierende Eigenschaften verleihen, die wohl auch in der aus der Bleiessigammoniakfällung hergestellten Lösung — nur um diese handelt es sich — zur Geltung kommen: bei anderen ist dies sicher nicht der Fall. Die etwaige Komplikation durch eine dieser Substanzen läßt sich aber vermeiden durch Ausschließung der betreffenden Medikamente, wie wir ja auch bei der Reduktionsprobe Salicylsäure, Benzoesäure, Chloral usw., kurz alle Körper, die Glucuronsäure bilden, auch Chrysophansäure und wohl noch manch andere Körper ausschließen müssen.

Der Einfluß von Medikamenten kommt also nicht in Betracht, man muß sie eben ausschließen können, dagegen ist ein anderer Umstand nicht ohne Bedeutung. Welche Körper des normalen Harns reduzierend wirken, wissen wir: es sind im wesentlichen doch nur Kreatinin und Harnsäure, die formaldehydgebenden Körper kennen wir dagegen außer dem Kreatinin nicht.¹⁾ Ich habe versucht, diese einigermaßen zu umgrenzen, jedoch ohne entscheidenden Erfolg. Vorausschicken möchte ich, daß formaldehydgebende Körper nicht oder nur in minimalen Mengen in das Harndestillat übergehen.

300 ccm Harn wurden in 3 Fraktionen zerlegt: eine in Alkohol absol. unlösliche und eine in Alkohol absol. übergehende; diese wurde zerlegt in eine in Ätheralkohol lösliche und eine darin unlösliche. Den Ausgangspunkt bildete der Harn nach starkem Eindampfen. Eine solche Teilung in 3 Fraktionen ist natürlich nicht durch einfache Extraktionen resp. Fällungen zu erreichen, sondern nur durch vielfache Wiederholung der betreffenden Operationen. Die Art des Vorgehens dabei ist wohl so selbstverständlich, daß ich nicht näher darauf einzugehen brauche. Die in Alkoholäther lösliche Substanz = Fraktion I und die darin unlösliche Fraktion II — natürlich durch Abdampfen völlig von Alkohol und Äther befreit — wurde

¹⁾ Harnstoff, Harnsäure, Purinbasen geben keine Reaktion.

zuerst auf je 100 ccm wässrige Lösung gebracht, aliquote Teile derselben dann dreifach verdünnt, sodaß die ursprüngliche Konzentration des Harns in ihnen wiederhergestellt war. Von der in Alkohol absol. unlöslichen Fraktion III, die nach dem Verreiben ein staubiges, feines, nicht hykroskopisches Pulver darstellte, wurde das Gewicht festgestellt und dann soviel davon gelöst, daß die Lösung gleichfalls der Konzentration des Harns entsprach. Von allen Lösungen wurden 2 ccm mit 5 ccm Oxydationsmischung behandelt, und die oft angeführte Reaktion mit Wittepepton, Eisenchlorid und rauchender Salzsäure angestellt. Nach mehrstündigem, in anderen Fällen 20stündigem Stehen der fertigen Reaktionen wurden diese auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt und die Intensität der Färbung verglichen. Am stärksten war die Färbung bei Fraktion II (in Alkohol und Äther unlöslich), am schwächsten bei Fraktion III (in Alkohol unlöslich), I stand in der Mitte. Bei der Oxydation mit der Lösung von III war aber sofort aufgefallen, daß das Verhalten der Mischung ein anderes war, wie bei I und II. Während bei diesen eine Trübung durch ausgeschiedenes Mangansuperoxyd beim Erhitzen bestehen blieb, wurde die Lösung aus III sofort entfärbt; es lag also die Möglichkeit vor, daß hier die Quantität der Übermangansäure zur Oxydation der formaldehydbildenden Substanz nicht ausreichte, weil ein Teil der Übermangansäure zur Oxydation anderer nicht formaldehydbildender Substanzen in Beschlag genommen wurde. Dies ergab sich nun in der Tat. Als zu der siedenden Mischung von 2 ccm der Lösung (entsprechend 2 ccm Harn) und 5 ccm Oxydationsmischung noch etwa 1 ccm einer 5%igen Kaliumpermanganatlösung hinzugefügt wurde, blieb eine Ausscheidung von Mangansuperoxyd bestehen, und die Färbung der schließlich erhaltenen Lösung war eine ganz andere, etwa der aus Fraktion II gleich. Ein gewisser Überschuß von Kaliumpermanganat muß also stets vorhanden sein, man muß etwas mehr davon zusetzen, wenn die betreffende Lösung sich sofort entfärbt.¹⁾ Dieselbe Reihenfolge hinsichtlich des Gehalts

¹⁾ In welchem Grade oxydable Substanzen den Ausfall der Reaktion beeinflussen können, zeigt sich an dem Verhalten des Blutsersums. Oxydiert

an formaldehydbildender Substanz und dieselbe Erscheinung bei Fraktion III ergab sich auch bei Anstellung der Schrywerschen Reaktion mit den oxydierten Mischungen.

Die aus Fraktion I erhaltene Formaldehydbildung wird man wohl ohne Zwang auf nicht genügende Befreiung von Fraktion II zurückführen können, sodaß nur II und III in Betracht kommen. Isolierungsversuche würden also von diesen Fraktionen auszugehen haben, wobei auf das in beiden ziemlich reichlich vorhandene Kreatinin Rücksicht zu nehmen wäre.

man 2 ccm desselben mit der gewöhnlich gebrauchten Oxydationsmischung, so fällt die Reaktion trotz der Gegenwart von Zucker im Serum negativ aus; wendet man aber statt dieser Lösung eine solche an, die in 100 ccm 20 ccm einer 5%igen Permanganatlösung enthält, so fällt die Reaktion unzweifelhaft positiv aus, womit übrigens nicht gesagt sein soll, daß die Reaktion notwendig nur auf den Zuckergehalt zu beziehen ist.