

# Die Shaffersche Oxydationsmethode zur Bestimmung der $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn.

Von

N. O. Engfeldt, Laborator.

---

Mit einer Abbildung.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der tierärztlichen Hochschule zu Stockholm.)  
(Der Redaktion zugegangen am 13. Februar 1917.)

---

Die  $\beta$ -Oxybuttersäure bildet, wie bekannt, zugleich mit dem Aceton und der Acetessigsäure die sogenannten Acetonkörper des Harns. Es liegen zwar schwerwiegende Gründe für die Annahme vor, daß alle diese Körper, obschon in sehr kleinen Mengen, als Endprodukte des Stoffwechsels in jedem normalen Harn zu finden sind, die bisher ausgeführten Untersuchungen normalen Harns haben indessen kaum zum einwandfreien Nachweise mehr als eines dieser Körper, nämlich des Acetons, geführt. Den Grund hierfür hat man wahrscheinlich darin zu suchen, daß das Aceton der am leichtesten chemisch nachweisbare der 3 Körper ist, während die beiden anderen entweder, wie die Acetessigsäure, sich äußerst leicht zersetzen, oder auch, wie die  $\beta$ -Oxybuttersäure, nicht genügend empfindliche und charakteristische Reaktionen besitzen, um in so kleinen Mengen, wie sie unter physiologischen Verhältnissen vorkommen, deutlich nachgewiesen werden zu können. Bei gewissen Störungen im Stoffwechsel kann jedoch eine bedeutende Zunahme der Menge der Acetonkörper zustande kommen, deren Nachweis sowohl für die Diagnose wie für die Prognose des anormalen Zustandes von großer Bedeutung sein kann.

Von den drei Acetonkörpern kommt unter pathologischen Verhältnissen die  $\beta$ -Oxybuttersäure im allgemeinen am reichlichsten vor. Bei einer größeren Menge Aceton und Acetessigsäure im Harn fehlt, der Erfahrung nach, niemals die  $\beta$ -Oxy-

buttersäure. Die Angabe Stadelmanns<sup>1)</sup>, daß die Abwesenheit des Acetons die Gegenwart von  $\beta$ -Oxybuttersäure (Crotonsäure) nicht ausschlieÙe, ist mit einer gewissen Vorsicht aufzunehmen, da die von ihm ausgeführten Proben zum Nachweis von Aceton bei näherer Untersuchung kaum als vollständig befriedigend betrachtet werden können (Geruchprobe, Eisenchloridprobe, seltener Liebens Jodoformprobe). Bei Anhäufung von Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure im Organismus (Acidosis) stellen sich allmählich ernste Vergiftungserscheinungen ein. Es ist deshalb von Bedeutung, daß man eine Zunahme der Menge der Acetonkörper über das Normale schon in einem frühen Stadium nachweisen und in Fällen von Acidosis ihre Zu- und Abnahme verfolgen kann. Im allgemeinen hat man sich indessen auf den Nachweis oder die Bestimmung des Acetons und der Acetessigsäure beschränkt, für welchen Zweck sich empfindliche, zuverlässige sowie verhältnismäßig einfache Methoden ausgearbeitet finden. Die für die quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure zugänglichen Methoden sind dagegen in hohem Grade mühselig und zeitraubend und kommen deshalb nur ausnahmsweise zur Anwendung. Da die  $\beta$ -Oxybuttersäure jedoch, wie schon oben erwähnt ist, der am reichlichsten vorkommende der Acetonkörper des Harns ist und außerdem quantitativ in keinem bestimmten Verhältnis zu den übrigen steht, sieht man leicht ein, daß die bei unseren gewöhnlichen Acetonbestimmungen erhaltenen Ziffernwerte ein ebenso unvollständiges wie unrichtiges Bild von dem wirklichen Gehalt des Harns an Acetonkörpern geben. Eine für klinische Zwecke anwendbare Methode zur Bestimmung des  $\beta$ -Oxybuttersäuregehaltes im Harn ist folglich in einem hohen Grade wünschenswert.

Unabhängig von einander gelang es Minkowski<sup>2)</sup> und Külz,<sup>3)</sup> im Harn von Zuckerkranken  $\beta$ -Oxybuttersäure nachzuweisen, nachdem schon kurz vorher Stadelmann (l. c.)

---

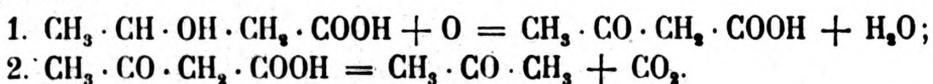
<sup>1)</sup> Stadelmann, Arch. für exp. Path. und Pharm., Bd. 17, S. 419 (1883).

<sup>2)</sup> Minkowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 18, S. 35 (1884).

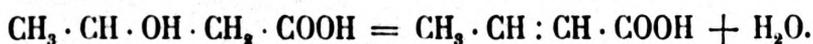
<sup>3)</sup> Külz, Zeitschr. f. Biol., Neue Folge, Bd. 2, S. 165 (1884).

aus diabetischem Harn  $\alpha$ -Crotonsäure als Zersetzungsprodukt der  $\beta$ -Oxybuttersäure gewonnen hatte.

Die  $\beta$ -Oxybuttersäure ist in reinem Zustand eine sirupdicke, schwer krystallisierbare Flüssigkeit. Durch Oxydation geht sie in Acetessigsäure über, die ihrerseits bei Erhitzung oder Verwahrung sich leicht in Aceton und Kohlendioxyd spaltet.



Bei Erhitzung bilden sich anhydridartige Verbindungen («Lactone») und außerdem kann sich, besonders bei Anwesenheit von Schwefelsäure in größeren Mengen,  $\alpha$ -Crotonsäure bilden:



Die  $\beta$ -Oxybuttersäure enthält ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und kann folglich in optisch aktiven Formen auftreten. Die im Harn vorkommende ist linksdrehend. Die spezifische Drehung  $[\alpha]_D = -24,12^\circ$  bei einer Temperatur von  $17-22^\circ$  und einer Konzentration unter  $12\%$ .

Im Anschluß an diese Eigenschaften — Oxydierbarkeit zu Aceton, Zersetzung in  $\alpha$ -Crotonsäure und optische Aktivität — sind verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure ausgearbeitet worden.

Von diesen Methoden hat sich die von Darmstädter<sup>1)</sup> angegebene Crotonsäuremethode nach den Untersuchungen von Magnus-Levy,<sup>2)</sup> Shindo,<sup>3)</sup> Shaffer<sup>4)</sup> und Embden-Schmitz<sup>5)</sup> als sehr unbefriedigende Resultate ergebend im großen ganzen unanwendbar erwiesen. Die von Shindo ausgearbeitete Modifikation der Methode Darmstädters scheint, seinen Analysenresultaten nach zu urteilen, eine befriedigendere

<sup>1)</sup> Darmstädter, Diese Zeitschr., Bd. 37, S. 355 (1902/03).

<sup>2)</sup> Magnus-Levy, Ergebn. der inn. Medizin und Kinderheilk., Bd. 1, S. 418 (1908).

<sup>3)</sup> Shindo, Über die quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn. Dissert. München 1907. S. 17.

<sup>4)</sup> Shaffer, Journ. of biolog. Chemistry, Bd. 5, S. 213 (1908—09).

<sup>5)</sup> Embden und Schmitz in Abderhaldens Handbuch III, Bd. 2, S. 926 (1910).

Ausbeute zu geben. Weitere Erfahrungen über dieselbe scheinen nicht vorzuliegen, und es sieht aus, als ob sie allzu zeitraubend und schwermanövrierbar wäre, um mit einigermaßen Erfolg in die Hände weniger geübter Chemiker gelegt zu werden und eine allgemeinere praktische Anwendung zu finden.

Die weitaus am meisten angewandte Methode der  $\beta$ -Oxybuttersäurebestimmung ist die polarimetrische. Die hierbei zur Anwendung gekommenen und auf einer direkten Untersuchung der Drehungsfähigkeit des Harns gegründeten Methoden haben sich bei näherer Untersuchung sämtlich als unanwendbar erwiesen. Augenblicklich ist man auf eine vorhergehende Isolierung der  $\beta$ -Oxybuttersäure durch Extraktion mit Äther hingewiesen, wonach nach Abdunstung des Äthers und Lösung des Rückstandes in Wasser die Drehungsfähigkeit des Extraktes bestimmt wird. Die Angaben über die nötige Zeit zur vollständigen Extraktion der  $\beta$ -Oxysäure wechseln bedeutend. Im allgemeinen dürfte jedoch eine Extraktionszeit von einem bis zu mehreren Tagen nötig sein. Über die Genauigkeit der Resultate ist zu bemerken, daß im Harn normal Levogyre, ätherlösliche Substanzen vorkommen, die zu einer Erhöhung der Resultate beitragen können. Andererseits haben Shaffer-Marriott<sup>1)</sup> bewiesen, daß die Extraktion mit Äther sich kaum quantitativ ausführen läßt. Bei Versuchen mit bestimmten, dem Harn oder einer Lösung zugesetzten Quantitäten Säure entstand ein Verlust von etwa 10%. Die Ursache hierfür glauben Shaffer-Marriott in dem Umstande gefunden zu haben, daß bei der langwierigen Extraktion eine gewisse Menge Säure durch Oxydation verloren geht. Die Polarisationsmethode schließt also in sich zwei Fehlerquellen ein, die jedoch in entgegengesetzter Richtung wirken und somit unter gewissen Umständen die gegenseitigen Wirkungen vollständig aufheben können. Das Erhalten richtiger Endresultate ist folglich bei der Anwendung der Methode nicht ausgeschlossen. Bei der Bestimmung von  $\beta$ -Oxybuttersäure in Harn, der größere Mengen Säure enthält, sind die Resultate

---

<sup>1)</sup> Shaffer-Marriott, Journ. of Biol. Chemistry, Bd. 16, S. 265 (1913—14).

auch von hinreichend großer Genauigkeit, während ein Harn mit geringer Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure infolge der Gegenwart der obengenannten levogyren Körper Werte gibt, die den wirklichen  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt um bis zu 100% überschreiten können. Diese Nachteile der Polarisationsmethode sind jedoch von geringer Bedeutung im Verhältnis zu dem, der in der sehr bedeutenden Zeit für die Ausführung der Bestimmung liegt, ein Umstand, der sicher auf die meisten abschreckend wirkt und die praktische Anwendbarkeit der Methode in unseren Kliniken in einem größeren Maßstabe unmöglich macht.

Hierzu kommt auch ein Umstand von praktischer Bedeutung, und zwar der, daß die Bestimmung des Gesamtaceton-gehaltes noch besonders nach ganz anderen Methoden vorgenommen werden muß. Die Bestimmung des Gesamtgehaltes des Harns an Acetonkörpern erfordert folglich eine unverhältnismäßig lange Zeit. Besonders ansprechend wirkt deshalb die von Shaffer<sup>1)</sup> vorgeschlagene Oxydationsmethode, die eine Bestimmung sämtlicher Acetonkörper im Harn in einer einzigen Folge ermöglicht. Die Shaffersche Methode der Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure stützt sich auf den Umstand, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure durch Oxydation in der Wärme mit Chromschwefelsäure in Aceton überführt wird; das gebildete Aceton wird nach Messinger-Huppert quantitativ bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure bei der Oxydation quantitativ in Aceton übergeführt wird und daß keine anderen im Harn vorkommenden Körper bei der Oxydation Anlaß zu flüchtigen jodverbrauchenden Substanzen geben, wären von der Methode befriedigende Resultate zu erwarten. Nach Shaffers eigenen Untersuchungen an reinen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen findet unter gewissen, genau angegebenen Bedingungen eine annähernd quantitative Umwandlung in Aceton statt. Dagegen fand Shaffer, daß im Harn normal oder zufällig vorkommende Substanzen, wie Zucker und Glukuronsäuren u. a., bei der Oxydation die Bildung flüch-

---

<sup>1)</sup> Shaffer, Journ. of biol. Chemistry, Bd. 5, S. 213 (1908—09).

tiger, jodverbrauchender Körper veranlaßten, die störend auf das Resultat einwirkten. Durch eine Vorbehandlung des Harns mit Bleiessig und Ammoniak glaubt er indessen die wichtigsten der obenerwähnten Substanzen, nämlich Zucker und Glukuronsäuren, zum größten Teil entfernen zu können, wonach dann die übrigen bei der Oxydation gebildeten störenden Substanzen durch Umdestillation mit Wasserstoffsperoxyd in alkalischer Lösung vollständig beseitigt werden können.

Mondschein<sup>1)</sup> hat bei einer von ihm ausgearbeiteten Methode der quantitativen Bestimmung der Milchsäure neben  $\beta$ -Oxybuttersäure die Shaffersche Oxydationsmethode angewendet und sie befriedigend gefunden, hat jedoch keine eingehendere Kontrolle der Richtigkeit derselben vorgenommen.

Emden und Schmitz<sup>2)</sup> haben indessen bei einer Nachprüfung der Shafferschen Methode gefunden, daß die Redestillation mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd die bei der Oxydation gebildeten störenden jodverbrauchenden Substanzen nicht vollständig zu entfernen vermag. Bei Verwendung reiner Traubenzuckerlösungen und einer Destillationsdauer, die der für die Ausführung der Shaffer-Bestimmungen notwendigen etwa entsprach, fanden die Verf. in dem zweiten Destillat ganz beträchtliche Mengen Jod gebunden. Bei Anwendung der Methode direkt auf den zuckerhaltigen Harn stimmten Parallelbestimmungen so wenig, daß die Verf. die direkte Anwendung der Shafferschen Methode auf zuckerhaltigen Harn nicht empfehlen konnten. Dagegen stimmten die Parallelbestimmungen an zuckerfreiem mit  $\beta$ -Oxybuttersäure versetztem Harn sehr gut.

Bei einem Vergleich zwischen der Polarisationsmethode und der Shafferschen Methode zeigte die letztere bei größeren Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure stets niedrigere Werte, jedoch oft über 90% der der ersteren. Bei Versuchen mit normalem oder schwach  $\beta$ -oxybuttersäurehaltigem Harn erhielten sie dagegen mit der Shafferschen Methode Werte, die nur einen geringen Bruchteil der auf polarimetrischem Wege erhaltenen aus-

<sup>1)</sup> Mondschein, Biochem. Zeitschr., Bd. 42, S. 91 (1912).

<sup>2)</sup> l. c.

machten. Da die Shaffersche Methode anscheinend etwas zu niedrige Werte liefert und die polarimetrische zu hohe, dürfte der richtige Wert zwischen dem polarimetrisch und dem durch Oxydation ermittelten liegen.

Anläßlich dieser von Embden und Schmitz ausgesprochenen Bemerkungen gegen die Shaffersche Oxydationsmethode hat Shaffer zusammen mit Marriott<sup>1)</sup> eine Nachprüfung seiner Methode ausgeführt. Die Verf. heben hervor, daß Gorslin und Cooke<sup>2)</sup> zwar kleinere Modifikationen bei der Verwendung der Oxydationsmethode vorgeschlagen, ihre Richtigkeit aber, im Gegensatz zu Embden und Schmitz, nicht in Frage gestellt hätten. Shaffer und Marriott bemerken weiter, daß die Methode auf der Untersuchung einer inaktiven, synthetischen, durch Umkrystallisation des Natriumsalzes gereinigten  $\beta$ -Oxybuttersäure mit einer durch Titration bestimmten Konzentration der Säure basiert sei. Die Resultate hätten eine Ausbeute von 98,8—103,3% der theoretischen ergeben, woraus sie den Schluß gezogen hätten, daß die Oxydation zu Aceton praktisch quantitativ verlaufe. Bei der Nachprüfung fanden Shaffer-Marriott indessen, genau wie Embden und Schmitz, daß bei der Oxydation einer mit Äther aus dem Harn extrahierten  $\beta$ -Oxybuttersäure niedrigere Werte, als die, welche die optische Untersuchung ergab, im allgemeinen 85—95%, erhalten wurden. Die Anmerkung von Embden und Schmitz, daß Traubenzucker bei Oxydation mit Kaliumdichromat in schwefelsaurer Lösung Anlaß zu jodverbrauchenden Substanzen gab, die sich durch Umdestillation mit Natronlauge und Wasserstoffsuroxyd nicht vollständig entfernen lassen, wurde von Shaffer und Marriott zugegeben und noch bestätigt. Die Verf. weisen indessen darauf hin, daß die Methode nicht für die direkte Bestimmung in zuckerhaltigem Harn, sondern nur nach der Behandlung dieses mit Bleiessig und Ammoniak ausgearbeitet worden sei.

---

<sup>1)</sup> Shaffer u. Marriott, Journ. of biol. Chemistry, Bd. 16, S. 265 (1913—14).

<sup>2)</sup> Gorslin u. Cooke, Journ. of biol. Chemistry, Bd. 10, S. 291 (1911—12).

Für die weitere Kontrolle und Untersuchung der Oxydationsmethode war indessen die Herstellung einer  $\beta$ -Oxybuttersäurelösung von vollständig chemisch reiner Beschaffenheit und vollkommen exakter Stärke notwendig. Die Versuche der Verf. hierin wurden mit Erfolg gekrönt und es gelang ihnen, ein für den Zweck anwendbares Ca-Zn-Salz herzustellen, das bei der Analyse folgende Zusammensetzung ergab:  $\text{CaZn}(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3)_4$ . Das aus der durch den Extrakt des Harns erhaltenen Säure hergestellte Salz hat eine weiße Farbe, ist in 10 Teilen Wasser löslich, nicht deliquiscierend und haltbar.

Bei der Oxydation wurde ein gewisses Quantum  $\beta$ -Oxybuttersäure (als CaZn-Salz) auf 600 ccm mit Wasser verdünnt, dem 30 ccm Schwefelsäure (Eigengewicht 1,59) zugesetzt wurden. Hierauf wurde die Mischung unter Hinzuträufeln einer stark verdünnten Kaliumdichromatlösung während  $3\frac{1}{2}$  Stunden der Destillation unterzogen, wobei eine berechnete Gesamtmenge von 0,5 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  angewendet wurde. Die Acetonmenge wurde im Destillat jodometrisch bestimmt. Als Resultat der Versuche ging hervor, daß ein Verlust von 5—10% erhalten wurde. Die Verf. geben an, daß sie viele vergebliche Versuche gemacht hätten, um die Methode zu verbessern und theoretisch richtige Werte zu erhalten. So wurden andere Oxydationsmittel und andere Säuren verwendet. Die Ursache der zu niedrigen Werte liegt, nach Ansicht der Verf., in der Bildung von Essigsäure anstatt des Acetons — ein Teil der bei der Oxydation primär gebildeten Acetessigsäure solle eine sogenannte Säurespaltung statt der Ketonspaltung erfahren. Die Verf. glauben nämlich auf experimentellem Wege festgestellt zu haben, daß das Aceton, einmal gebildet, nicht unter den bei der Oxydationsmethode vorhandenen Umständen angegriffen wird. Eine etwas höhere Ausbeute erhielten die Verf. dadurch, daß sie das Dichromat äußerst langsam hinzusetzten und die Destillation eine verhältnismäßig lange Zeit stattfinden ließen. Wenn somit in den ersten 2—3 Viertelstunden nur 0,09 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  und dann in der folgenden Stunde 0,09 g hinzugesetzt wurden und die Destillation 4 Stunden ausgedehnt wurde, erhielten sie zwischen 95,2—97,5 g wechselnde

Ausbeuten. Die Verf. halten es für wahrscheinlich, daß die Ausbeute bei noch langsamerem Zusatz von Dichromat und noch längerer Destillation annähernd 100% wird. Da die Ausbeute indessen nach den zuerst angegebenen Bedingungen recht konstant zu sein scheint, schlagen die Verf. eine Korrektur der auf die ebengenannte Weise erhaltenen Werte durch Erhöhung derselben um 10% vor. Bei der Anwendung der Oxydationsmethode auf Harn sind nach den Verf. folgende Umstände in Betracht zu ziehen. Im Harn kommen normal oder zufällig Stoffe vor, die bei der Oxydation Anlaß zu flüchtigen jodverbrauchenden Substanzen geben. Zu solchen Stoffen rechnen die Verf. Glukuronsäuren, Zucker-, Milch-, Butter- und Ameisensäure sowie Phenol.

Durch drei Verfahren glauben die Verf. den störenden Einfluß dieser Körper eliminieren zu können. Glukuronsäuren und Zucker werden durch Fällung mit Bleiessig und Ammoniak entfernt. Phenol, Buttersäure und Ameisensäure durch Destillation des angesäuerten Filtrats, wobei auch das Aceton und die Acetessigsäure entfernt werden. Aus dem erhaltenen Destillat läßt sich das Aceton durch Umdestillation in alkalischer Lösung isolieren und dann auf jodometrischem Wege quantitativ bestimmen. Möglicherweise vorhandene Milchsäure wird bei der Behandlung mit Kaliumdichromat zu Acetaldehyd aufoxydiert, aber durch Umdestillation des Destillats mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd beseitigt. Die Verf. haben auch Untersuchungen eines normalen Harns ausgeführt und hierbei im Mittel eine gerade 30 mg Aceton entsprechende Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure oder ungefähr 50 mg pro Liter gefunden. Die Verf. halten es für glaublich, daß diese Menge die physiologisch im Harn vorkommende ist. Einen wesentlichen Einfluß auf das Resultat kann diese unbedeutende Menge, wenigstens bei der Untersuchung eines eine beträchtlichere Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure enthaltenden Harnes, nicht ausüben.

Die besonderen Vorschriften für die Ausführung der Bestimmung im Harn weichen nur unwesentlich von den in Shaffers erster Arbeit angegebenen ab. Da ich indessen weiter hinten auf eine kritische Untersuchung der Methode, wie sie

zuletzt formuliert ist, eingehen werde, halte ich es für notwendig, dieselbe vollständig wiederzugeben.

25—100 ccm (eventuell mehr, gewöhnlich 50 ccm) werden mit einer Pipette gemessen und in einen 200—300 ccm Wasser enthaltenden Meßkolben von 500 ccm gefüllt. Bleiessig (Pharm. U. S. A.) in gleichem Volumen wie der angewandte Harn — bei geringem oder keinem Zucker im Harn nur die Hälfte — wird hinzugesetzt und die Mischung umgeschüttelt. Ein der Hälfte des Volumens des angewandten Bleiessigs entsprechendes Volumen konzentrierten Ammoniaks wird hinzugesetzt, der Kolben bis zur Marke mit Wasser gefüllt, umgeschüttelt und nach einigen Minuten durch ein gefaltetes Filtrum filtriert. 200 ccm des Filtrates werden in einen 1000 ccm-Kjeldahl-Kolben gegossen, mit 400 ccm Wasser verdünnt, 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure sowie etwas Talk zugesetzt und die Mischung destilliert, bis etwa 200 ccm überdestilliert haben (Dest. A.). Durch Hinzuträufeln von Wasser aus einem Scheidetrichter ist das Volumen im Destillierkolben auf mindestens 400—500 ccm zu halten. Das Destillat A, das präformiertes und von Acetessigsäure gebildetes Aceton enthält und in einem anderen Kjeldahl-Kolben aufgesammelt wird, wird nach Zusatz von 10 ccm 10%iger Natronlauge (ungefähr 20 Min.) umdestilliert. (Dest. A 2.) Im Destillat A 2 wird der Acetongehalt nach Messinger-Huppert jodomotrisch bestimmt. 1 ccm  $n_{10}$ -Jod = 0,967 mg Aceton.

Der auf die angegebene Weise vorher destillierte Harn wird unter Hinzutröpfeln einer verdünnten Kaliumdichromatlösung, sodaß das Volumen konstant erhalten wird, einer fortgesetzten Destillation unterzogen. Eine Gesamtmenge von 0,5—1 g  $K_2Cr_2O_7$  genügt im allgemeinen, und falls die Farbe der Lösung nicht grün wird, wird nicht mehr als 1 g zugegeben. Sehr selten sind 2—3 g Chromat nötig, und im allgemeinen nur, wenn der Zucker nicht vollständig entfernt worden ist. 10 ccm einer 10%igen  $K_2Cr_2O_7$ -Lösung werden auf 100 ccm verdünnt und für jede Bestimmung angewendet. 20 ccm der letzteren Lösung (0,20 g  $K_2Cr_2O_7$ ) werden mit Hilfe eines Scheidetrichters langsam hinzugesetzt und hierauf 10 ccm alle 15—20

Minuten, bis alles hinzugesetzt ist. Sollte die Lösung grün werden, muß natürlich mehr Chromat beigegeben werden. Die Oxydation ist nach dreistündiger mäßiger Destillation abgeschlossen (Dest. B.). Das Destillat B, das zur Vermeidung einer Erneuerung der Vorlage in einem hinreichend geräumigen Kolben aufzusammeln ist, wird ungefähr 20 Minuten lang unter Zusatz von 10 ccm 10%iger Natronlauge und 25 ccm 3%igen Wasserstoffsperoxyds umdestilliert. Hierbei wird die Mischung vorsichtig erhitzt, bis das Wasserstoffsperoxyd dekomponiert ist. (Dest. B 2.) Im Destillat B 2 wird der Jodverbrauch nach Messinger-Huppert bestimmt und auf  $\beta$ -Oxybuttersäure umgerechnet.

Die erhaltenen Werte werden um 10% erhöht.

1 ccm  $n_{10}$ -Jod = 1,734 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure.

### Eigene Untersuchungen.

Schon im Laufe des Jahres 1913, bevor noch die oben genannte letzte Arbeit Shaffer-Marriots veröffentlicht war, hatte ich mich mit einer kontrollierenden Untersuchung über die Verwendbarkeit der Oxydationsmethode beschäftigt. Bei diesen Versuchen benutzte ich eine von Kahlbaum, Berlin, hergestellte chemisch reine, inaktive  $\beta$ -Oxybuttersäure, deren Stärke auf titrimetrischem Wege bestimmt wurde. Hierbei irrte ich mich betreffs der Beschaffenheit der inaktiven  $\beta$ -Oxybuttersäure, indem ich aus meinen ersten Analysenresultaten den Schluß zog, daß sie sich ohne Schwierigkeit quantitativ in Aceton überführen ließ. Konzentrierte  $\beta$ -Oxybuttersäure enthält indessen recht große Quantitäten anhydridartige Verbindungen, analog den in der Milchsäure vorkommenden Dilactylsäure und Lactid, die sich durch eine direkte Titrierung mit Lauge nicht quantitativ bestimmen lassen. Durch Behandlung mit Alkali in Überschuß bei Wasserbadwärme werden dagegen die anhydridartigen Körper hydrolysiert und können dann durch Zurücktitrierung bestimmt werden. Bei direkter Titrierung fand ich somit in einem gewissen Quantum einen Alkaliverbrauch von 7 ccm, während der Verbrauch nach der

Hydrolyse auf 8,2 ccm stieg. Die  $\beta$ -Oxybuttersäure enthielt folglich etwa 15% «Lactone». Bei Versuchen nach der ersten Vorschrift Shaffers mit Lösungen der obenerwähnten Säure erhielt ich etwa 15% zu niedrige Werte.

Dieser Verlust entspricht gerade dem Teil der  $\beta$ -Oxybuttersäure, der als «Lacton» vorkommt und der bei der direkten titrimetrischen Bestimmung der Aufmerksamkeit entgeht. Daß diese anhydridartigen Verbindungen auch in stark verdünnter Wasserlösung eine ungewöhnliche Resistenz besitzen, geht aus einer später vorgenommenen Untersuchung hervor, die ergab, daß eine  $\beta$ -Oxybuttersäurelösung von etwa 0,8% Stärke diese Anhydride noch nach zweijähriger Verwahrung in unveränderter Menge enthielt. Bei Oxydation nach vorhergehender Hydrolyse mit Alkali erhielt ich indessen keine Verbesserung der Ausbeute. Als Resultat dieser Untersuchungen ging indessen hervor, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure sich nicht unter den angegebenen Bedingungen quantitativ in Aceton übertragen lasse. Ob Shaffer bei der titrimetrischen Bestimmung der für die Untersuchung nötigen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen die erwähnten Anhydride genügend berücksichtigt hat, geht aus seinem Bericht nicht hervor, es erscheint aber nicht unwahrscheinlich, daß dies nicht geschehen ist, und daß dies die Ursache der von ihm erhaltenen scheinbar quantitativen Ausbeuten bei der Oxydation gewesen ist. Die von Shaffer selbst unter Anwendung von CaZn-Salz der  $\beta$ -Oxybuttersäure als Ursubstanz bewerkstelligte Nachprüfung der Methode hat indessen das Resultat geliefert, daß die früheren Angaben über die Ausbeute bei der Oxydation falsch waren, und daß diese mit einem Verlust von etwa 10% verläuft. Der für eine quantitative Methode wenig zusagende Umstand, Werte zu liefern, die mit bis 10% unter die theoretisch richtigen heruntergehen, wirkt keineswegs ermunternd zu neuen Versuchen, besonders wenn, wie es hier der Fall ist, die Methode zeitraubend und verhältnismäßig schwer manövrierbar ist. Die Idee Shaffers, sämtliche Acetonkörper des Harns in einer einzigen Reihenfolge und auf gleichartige Weise zu bestimmen, erschien mir indessen von einem so augenscheinlichen Wert, daß ich die Methode im

Verlaufe des Jahres 1915 zu erneuerter Bearbeitung aufnahm. Meine Absicht war, teils die Richtigkeit der in der letzten Arbeit Shaffer-Marriotts gelieferten Angaben über die Ausbeute u. a. bei der Oxydation zu kontrollieren, teils durch eine Modifikation der Ausführung theoretisch richtige Werte zu erzielen zu suchen, und schließlich, gestützt auf die gesammelte Erfahrung, eine für klinische Zwecke geeignetere Methode als die Shaffersche auszuarbeiten, da diese letztere allzuviel Zeit in Anspruch nimmt, um eine allgemeinere Anwendung erhalten zu können. Im Anschluß an obenberührte Gesichtspunkte ist die folgende Arbeit ausgeführt worden.

Um dem Leser einen Überblick über den Gang der Arbeit zu geben, teile ich hier unten eine schematische Aufstellung derselben mit.

A. Kontrollierende Untersuchung der Shaffer-Marriottschen  $\beta$ -Oxybuttersäurebestimmungsmethode.

1. Bereitung der für die Untersuchung nötigen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen.
2. Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure nach Shaffer-Marriott.
3. Versuche mit größeren Mengen Chromat und längerer Oxydationszeit.
4. Die Einwirkung des Traubenzuckers auf das Resultat der Oxydation.
5. Die Fällbarkeit des Traubenzuckers mit Bleiessig in ammoniakalischer Lösung.
6. Untersuchung normalen Harns mit und ohne Zusatz von Traubenzucker.

B. Versuche, durch gewisse Detailveränderungen der Shaffer-Marriottschen Methode eine quantitative Ausbeute zu erzielen.

C. Klinische Methoden zur Bestimmung des Gesamtacetons und der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn.

1. Versuche mit reinen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen.
2. Anwendung der Methode auf den Harn.
  - a) Versuche mit normalem Harn.
  - b) Versuche mit normalem, mit Traubenzucker und  $\beta$ -Oxybuttersäure in wechselnden Mengen versetztem Harn.
3. Bestimmungen des Gesamtacetons und der  $\beta$ -Oxybuttersäure nach einer von mir modifizierten Shaffer-Methode.
4. Vergleichende Untersuchung der Resultate bei der Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn nach der Polarisations- und Oxydationsmethode.

**A. Kontrollierende Untersuchung der Shaffer-Marriottschen  $\beta$ -Oxybuttersäurebestimmungsmethode.****1. Bereitung der für die Untersuchung nötigen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen.**

Als Ursubstanzen bei der Untersuchung der  $\beta$ -Oxybuttersäure habe ich teils eine synthetische, inaktive, von Kahlbaum hergestellte Säure und teils ein nach der Vorschrift Shaffers aus der durch Ätherextraktion aus diabetischem Harn erhaltenen  $\beta$ -Oxybuttersäure hergestelltes Ca-Zn-Salz angewendet. Gewisse Mengen der Säure bezw. des Salzes wurden in Wasser gelöst und auf ein bestimmtes Volumen verdünnt. Eine gewisse Menge dieser Lösungen wurde für jede besondere Analyse mit kontrollierten Pipetten gemessen.

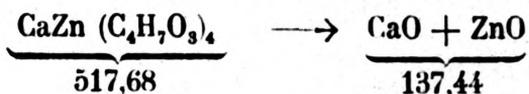
Der Gehalt der Lösung an freier inaktiver  $\beta$ -Oxybuttersäure wurde auf titrimetrischem Wege bestimmt. Hierbei wurde die Lösung erst  $\frac{1}{2}$  Stunde der Hydrolyse in Wasserbadwärme mit  $\frac{1}{10}$ -normaler Lauge in Überschuß unterzogen, nach der Abkühlung dasselbe Volumen  $\frac{1}{10}$ -normale Säure hinzugesetzt und der Alkaliverbrauch dann durch Zurücktitrierung mit  $\frac{1}{10}$ -normaler Lauge (Phenolphthalein als Indikator) bestimmt. Bei der Titration wurde kohlendioxidfreie Lauge angewendet. Während der Hydrolyse und bei der Abkühlung wurde der Kolbeninhalt durch eine mittels eines durchbohrten Gummipfropfens am Kolbenhalse befestigte doppeltgebogene Glasröhre, kombiniert mit einer mit Lauge gefüllten Peligotsröhre, vor dem Kohlendioxid der Luft geschützt. Bei der Herstellung des Ca-Zn-Salzes bin ich in der Hauptsache der Shafferschen Vorschrift gefolgt. Die Abweichungen sind nur technischer Art, indem die Arbeitsmethode sich nach den mir zu Gebote stehenden Apparaten richten mußte. Etwa 10 Liter stark  $\beta$ -oxybuttersäurehaltiger Harn wurden im Wasserbad zu Sirupdicke eingedampft, mit 5 Liter 96%igem Spiritus gefällt<sup>1)</sup> und mit etwa 100 ccm vorher mit 300 ccm Wasser ver-

<sup>1)</sup> Die sirupdicke Flüssigkeit eignet sich infolge ihrer Geneigtheit, mit dem Äther Emulsionen von großer Resistenz zu bilden, nicht für direkte Extraktion.

dünnter konzentrierter Schwefelsäure angesäuert. Die Mischung wurde filtriert und mit  $1\frac{1}{2}$  Liter Wasser versetzt, mit Natronlauge neutralisiert und von neuem im Wasserbade auf etwa einen Liter abgedampft, nach der Abkühlung mit 25%iger  $H_2SO_4$  angesäuert sowie wiederholt (6mal) mit Äther ausgeschüttelt. Nach der Abdestillation des Äthers verblieb eine braune dickflüssige Flüssigkeit, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Ca-Zn-Salzes diente. 40 g wurden in etwa 300 ccm Wasser gelöst und die Lösung in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine Teil wurde mit  $CaCO_3$  versetzt, etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde bis zum Kochen erhitzt, mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Der andere Teil wurde mit eben gefälltem und durch Wässern von Sulfat befreitem Zinkhydrat<sup>1)</sup> versetzt, das durch Fällung einer Lösung von 40 g krystallisiertem Zinksulfat mit 40 g 25%iger Natronlauge hergestellt war. Die auf die angegebene Weise erhaltenen Calcium- und Zinklösungen wurden gemischt und zu beginnender Krystallisation abgedampft, wo das doppelte Volumen 96%igen Spiritus zugesetzt wurde. Nach dem Erkalten wurde der entstandene Niederschlag des Doppelsalzes auf dem Filtrum aufgesammelt, mit 90%igem Spiritus gewaschen sowie durch Pressen zwischen Filtrierpapier weiter von der Mutterlauge befreit und bei gelinder Wärme getrocknet. Der trockne Niederschlag, der etwas grau war, wurde aufs neue in einer genügenden Menge kochenden Wassers gelöst, mit Tierkohle behandelt, filtriert und mit dem doppelten Volumen Spiritus gefällt. Der erhaltene schneeweiße Niederschlag wurde noch einmal mit Spiritus gefällt sowie zweimal aus Wasser umkrystallisiert, bei  $105^\circ C.$  und schließlich vollständig im Exsikkator getrocknet. Das Ca-Zn-Salz hat nach Shaffer die Zusammensetzung  $CaZn(C_4H_7O_3)_4$  und somit ein Molekulargewicht von 517,68, dem 416,24 g freie  $\beta$ -Oxybutter-säure entsprechen. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0,80405 erhält man folglich die dem Doppelsalz entsprechende Menge freie Säure. Da das Resultat der Shafferschen Ana-

<sup>1)</sup> Shaffer schlägt Zinkcarbonat vor, das indessen bei Versuchen schlechte Ausbeuten ergab. Auch Zinkoxyd reagiert träge mit der rohen Säure. Eben gefälltes Zinkhydrat gab dagegen eine befriedigende Ausbeute.

lyse des Doppelsalzes keinen Anlaß zu einem Zweifel an dessen Zusammensetzung gibt, habe ich mich der Kontrolle wegen nur auf die Bestimmung des Aschengehaltes des von mir hergestellten Salzes beschränkt. 0,6437 g Ca-Zn-Salz wurden über einer gewöhnlichen Bunsenflamme verbrannt und die Verbrennung durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniumnitrat in kleinen Portionen vervollständigt. Die Asche wurde dann in der Gebläseflamme zu konstantem Gewicht geglüht (45 Min.). Nach der Abkühlung im Exsikkator wog die Asche 0,1723 g.



Theoretisch enthalten 0,6437 g Ca-Zn-Salz

$$\frac{137,44}{517,68} \cdot 0,6437 = 0,1709 \text{ g CaO} + \text{ZnO}$$

dem eine gefundene Menge von 0,1723 g entspricht, also eine Differenz von 0,0014 g, was jedoch als befriedigend zu betrachten ist. Durch Vorprüfung habe ich mich der Sicherheit wegen teils davon überzeugt, daß das Zinkoxyd sich bei Glühung in der Gebläseflamme nicht verflüchtigt, und teils, daß das angewandte Ammoniumnitrat frei von feuerfesten Verunreinigungen war.

## 2. Bestimmung der $\beta$ -Oxybuttersäure nach Shaffer-Marriott.

Zur Kontrolle der von Shaffer-Marriott gelieferten Angaben über die Ausbeute bei der Oxydation der  $\beta$ -Oxybuttersäure führte ich eine Serie Untersuchungen reiner  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen in genauer Übereinstimmung mit den von den Verfassern gelieferten Vorschriften aus. Bei der Oxydation wurde somit ein gewisses Quantum  $\beta$ -Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) mit Wasser auf 60 ccm verdünnt, mit 30 ccm Schwefelsäure (Eigengewicht 1,59) angesäuert und nach Zusatz einer Messerspitze Talk unter Hinzuträufelung einer stark verdünnten Kaliumdichromatlösung von einem in den Kolben eingepaßten Scheidetrichter destilliert. Der Zufluß des Dichromates wurde so geregelt, daß das Volumen der Destillationsflüssigkeit konstant erhalten und eine Gesamtmenge von 0,5 g

Tabelle I.

Nr.	β-Oxy- butter- säure mg	Gesamt- menge K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> g	Dest. A. Nach 3 1/2 Std. Dest.			Dest. B. Nach Redestillation mit NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Dest. C. Nach fortgesetzter Dest.			Dest. A + C		
			Jod- ver- brauch n/10-J. ccm	Berechn. Menge β-Oxy- butter- säure mg	Aus- beute %	Jod- ver- brauch n/10-J. ccm	Berechn. Menge β-Oxy- butter- säure mg	Aus- beute %	Aceton nach Form- mer- Eng- feldt	De- stilla- tionszeit Std.	Jod- ver- brauch n/10-J. ccm	Gesamt- Jodver- brauch n/10-J. ccm	Berechn. Gesamt- menge β-Oxy- butters. mg	Ge- samt- aus- beute %
1	27,13	0,50	14,4	24,97	92,1	13,7	23,76	87,6	+	2	0,30	14,7	25,49	93,9
2	27,13	0,50	14,6	25,32	93,3	13,8	23,93	88,2	+	2	0,30	14,9	25,84	95,2
3	54,27	0,50	28,8	49,93	92,0	26,4	45,78	84,4	+	2	1,10	29,9	51,85	95,5
4	54,27	0,50	28,9	50,11	92,3	26,7	46,30	85,3	+	2	1,00	29,9	51,85	95,5
5	108,54	0,50	54,0	93,64	86,3	50,2	87,05	80,2	+	3	3,50	57,5	99,70	91,9
6	108,54	0,50	54,2	93,98	86,6	49,0	84,97	78,3	+	3	4,1	58,3	101,09	93,1
7	162,81	0,75	85,5	148,26	91,1	79,8	138,37	85,0	+	3	1,2	86,7	150,34	92,3
8	162,81	0,75	84,7	146,87	90,2	79,2	137,33	84,4	+	3	2,3	87,0	150,86	92,7

Chromat angewendet wurde. Nach  $3\frac{1}{2}$  stündiger Destillation wurde der Jodverbrauch nach Messinger bestimmt (Dest. A). (Tabelle I). Die Ausbeuten wechseln zwischen 86,3—93,3%. In den Proben 1—4 halten sich die Ausbeuten bei ungefähr 92—93%, während die Proben 5—6 bedeutend niedrigere Werte, und zwar zwischen 86—87% zeigen. In den Proben 7—8 sind die Werte indessen wieder auf 90—91% gestiegen. Die Ursache dieser Schwankungen ist zweifellos in einer allzu knapp bemessenen Chromatmenge zu suchen. In den Proben 1—4, wo der wirkliche  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt 50 mg nicht nennenswert überschreitet, erscheint die Chromatmenge hinreichend, bei einem Quantum von 100 mg ist sie aber offenbar zu gering, trotzdem sie die theoretisch notwendige um das Fünffache übersteigt. Erhöht man indessen die Chromatmenge, wie in den Proben 7—8, auf 0,75 g, so verbessern sich die Ausbeuten, obschon die bei diesen Versuchen verwendete  $\beta$ -Oxybuttersäuremenge über 160 mg beträgt. Die Ausbeuten sind somit keineswegs quantitativ, und eine fortgesetzte Destillation zeigt, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure durchaus nicht vollständig verbraucht ist, denn das neue Destillat gibt deutlich positiven Ausschlag für Aceton nach Frommer-Engfeldt.<sup>1)</sup> Wird die Destillation unter Hinzuträufelung von Wasser bis zum konstanten Volumen um noch 2—3 Stunden ausgedehnt, so verbraucht das so erhaltene Destillat Jod in wechselnden Mengen (Dest. C.). Legt man diesen Jodverbrauch zu dem bei der ersten Destillation erhaltenen, so steigen die Ausbeuten auf zwischen 91,9—95,5% wechselnde Werte. Setzte man die Destillation weiter fort, so konnte man in den folgenden Destillaten mit der Frommer-Engfeldtschen Probe nur die kleinsten Spuren von Aceton nachweisen, woraus man den Schluß ziehen kann, daß praktisch alle  $\beta$ -Oxybuttersäure verbraucht worden ist. Erstreckt man somit die Destillation auf 6—7 Stunden, so verbessern sich die Ausbeuten zwar einigermaßen, ein Verlust von 5—8% scheint aber gleichwohl stattzufinden. Die Verluste können keiner Unvorsichtigkeit bei der Destillation selbst zugeschrieben werden, da die Destillation

<sup>1)</sup> Engfeldt, Berlin. Klin. Wochenschrift Nr. 18, 1915.

unter Beobachtung der größten Genauigkeit in der Abkühlung sowie in der Beschaffenheit des Destillationsapparates vor sich ging. Die für die Zusammensetzung des Destillationsapparates erforderlichen Pfropfen waren aus Kautschuk und die Vorlagen luftdicht mit den Kühlern zusammengekoppelt, so daß sie nur durch mit Wasser gefüllte Kugelröhren mit der äußeren Luft in Verbindung standen. Daß diese Anordnungen zur Vermeidung von Acetonverlusten bei der Destillation genügen, davon habe ich mich außerdem durch Versuche mit Acetonlösungen von bekannter Stärke überzeugt.

Shaffer-Marriott meinen selbst, daß die wahrscheinliche Ursache des bei der Oxydation auch von ihnen festgestellten Verlustes in einer partiellen Spaltung der bei der Oxydation primär gebildeten Acetessigsäure unter Bildung von Essigsäure zu suchen sei. Als Stütze für diese Ansicht führen die Verfasser das Resultat einer Destillation unter Zusatz von Chromat in größerer Menge an, wo eine Bildung von Essigsäure deutlich nachweisbar war. Daß indessen nicht der ganze Verlust bei der Oxydation einer Reaktion in der oben-erwähnten Richtung zugeschrieben werden kann, zeigt eine Untersuchung des Verhältnisses des Destillates zur alkali-ammoniakalischen Silberlösung.<sup>1)</sup> Bei direkter Untersuchung des erhaltenen Destillates mit diesem Reagens war zwar kaum eine wahrnehmbare Reduktionsfähigkeit zu beobachten, nach einer vorgenommenen Konzentration durch Umdestillation erhielt man aber einen deutlichen positiven Ausschlag. Das Destillat enthält folglich außer Aceton auch reduzierende jodverbrauchende Substanzen (Aldehyde und Ameisensäure?). Diese lassen sich zwar durch eine Umdestillation mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung entfernen (Dest. B.), diese Behandlung hat aber eine weitere Senkung der Ausbeute, und zwar auf niedrigstens 80,2 und höchstens 88,2%, im Mittel für 8 Bestimmungen etwa 84% der theoretischen, zur Folge. Dieses Verhältnis ist bemerkenswert, da Shaffert-Marriott

<sup>1)</sup> 3 g Silbernitrat, 3 g Natronhydrat, 100 ccm 5% iges Ammoniak. Die Probe wurde in einem mit konzentrierter Schwefelsäure gereinigten Cylinder, sowie im Schutz gegen Licht ausgeführt.

eine solche Umdestillation bei der Anwendung der Methode auf Harn benutzen. Die von ihnen vorgeschlagene Korrektion von 10% Zuschlag auf die erhaltenen Werte ist somit bei der Anwendung der Methode auf Harn allzu gering und müßte eher auf 20% gesetzt werden. (Betreffend die Einzelheiten bei der Umdestillation mit Wasserstoffsperoxyd verweise ich auf das hier unter der Rubrik: «Die Einwirkung des Traubenzuckers auf das Resultat der Destillation» angeführte.)

Um indessen Material zur Beurteilung des Resultates der Anwendung der Shaffer-Marriottschen Methode auf den Harn zu erhalten, nahm ich folgende Versuche vor: 100 ccm normaler Harn mit 2 g chemisch reinem Traubenzucker versetzt, wurde mit 100 ccm Bleiessig und 50 ccm konzentriertem Ammoniak gefällt, auf 1000 ccm verdünnt und nach 30 Minuten filtriert. 800 ccm des Filtrates wurden in 4 gleiche Teile geteilt, mit gewissen Quantitäten  $\beta$ -Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) versetzt und unter genauer Befolgung der Einzelheiten in der Shaffer-Marriottschen Vorschrift der Destillation unterzogen. Für die Oxydation wurde die von den Verfassern als die höchste angegebene Zeit, nämlich 3 Stunden, angewendet.

Nach Umdestillation mit Wasserstoffsperoxyd und Natronlauge erhielt ich folgende Resultate:

1. Zugesezte Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure 27,13 mg, gefunden 21,50 mg, Ausbeute 79,2%.
2. Zugesezte Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure 27,13 mg, gefunden 22,49 mg, Ausbeute 82,9%.
3. Zugesezte Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure 54,27 mg, gefunden 42,31 mg, Ausbeute 79,9%.
4. Zugesezte Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure 54,27 mg, gefunden 41,96 mg, Ausbeute 77,3%.

Wurde die Destillation über die angegebene Zeit fortgesetzt, so erhielt man ein Destillat, das mit alkalischer Jodlösung unmittelbar eine kräftige Acetonreaktion gab, was bewies, daß die Oxydation nicht vollständig war, sondern daß noch unzerlegte  $\beta$ -Oxybuttersäure in reichlicher Menge vorhanden war. Die Ausbeuten betragen im Mittel ungefähr 80% der theoretischen, die erhaltenen Werte sollten folglich um gegen 25% erhöht werden, um einigermaßen richtig zu werden.

Die Ursachen des niederschlagenden Resultates bei der Anwendung der Shaffer-Marriottschen Methode auf Harn sind vor allem in der allzu kurzen Destillationszeit zu suchen. Bei Versuchen mit reinen  $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen fanden Shaffer-Marriott zwar nach  $3\frac{1}{2}$ -stündiger Destillation eine Ausbeute von 90—95%, die Titrationsen wurden aber hier doch direkt im ersten Destillat ohne Umdestillation mit Wasserstoff-superoxyd ausgeführt. In der Vorschrift über die Anwendung der Methode auf den Harn wird indessen die obengenannte Umdestillation aufgeführt und die Zeit für die Oxydation willkürlich auf 2—3 Stunden beschränkt, alles Umstände, die unvorteilhaft auf das Resultat einwirken. Bei Anwendung der Methode auf den Harn kommt außerdem ein zu berücksichtigender Faktor hinzu, nämlich die Anhäufung von Ammoniumsulfat, die ihren Ursprung von der Vorbehandlung des Harns mit Bleiessig und Ammoniak herleitet. Das in der Destillationsflüssigkeit vorhandene Ammoniumsulfat vermindert und verzögert nämlich die oxydierende Fähigkeit des Chromates in einem bemerkenswerten Grade, ein Umstand, der aus den untenstehenden Versuchen direkt hervorgeht.

54,27 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) wurden mit 600 ccm Wasser gemischt, mit 7 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und unter Hinzutröpfelung von verdünntem Kaliumdichromat 3 Stunden destilliert, wobei eine Gesamtmenge von 1 g Chromat angewendet wurde. Dieselben Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure wurden unter ähnlichen Verhältnissen, bei Gegenwart von aus 50 und 100 ccm 25%igem Ammoniak hergestelltem Ammoniumsulfat, der Oxydation unterzogen. Bei der Bestimmung des Jodverbrauches in den erhaltenen Destillaten erhielt ich folgende Resultate:

1. ohne $\text{Am}_2\text{SO}_4$ . . . . .	Jodverbrauch 21,6 ccm $\frac{n}{10}$ -Jod
2. mit $\text{Am}_2\text{SO}_4$ von 50 ccm $\text{H}_3\text{N}$	„ 6,9 „ „
3. „ $\text{Am}_2\text{SO}_4$ „ 100 „ $\text{H}_3\text{N}$	„ 4,6 „ „

Der Unterschied im Jodverbrauch zwischen Probe 1 und den Proben 2 und 3 ist auffallend. In der Probe 3 war bei der Behandlung mit Jod und Alkali kein dem bloßen Auge wahrnehmbarer Jodoformniederschlag zu beobachten. In der

Probe 2 war der Jodoformniederschlag sehr unbedeutend, während in der Probe 1 sofort ein außerordentlich kräftiger Niederschlag entstand. Wurde die Destillation bei der Probe 2 und 3 nach Zusatz von 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure, bzw. 1 g Chromat fortgesetzt, so zeigte sich, daß die Oxydation unmittelbar unter Bildung von Aceton in beträchtlicher Menge zustande kam. Die Gegenwart von Ammoniumsulfat vermindert folglich die Oxydationsfähigkeit des Chromates in einem wesentlichen Grade, seinem Einfluß auf die Oxydationsfähigkeit des Chromates scheint man jedoch mitunter durch Erhöhung der Chromatmenge selbst oder auch der Schwefelsäuremenge entgegenwirken zu können. Die eigentliche Ursache der Einwirkung des Ammoniumsulfates ist ohne Zweifel in einer durch dieses verursachten Herabsetzung des Dissoziationsgrades der Schwefelsäure und des Chromats zu suchen.

Als allgemeines Endurteil über die Shaffersche Mariottsche Methode zur Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn kann man somit feststellen, daß dieselbe ein unbefriedigendes Resultat liefert.

### 3. Versuche mit größeren Mengen Chromat und längerer Oxydationszeit.

Da aus den vorhergehenden Versuchen teils hervorgegangen ist, daß die vorgeschriebene Menge Kaliumdichromat bisweilen zu klein ist, und teils, daß die Zeit für die Destillation zu knapp gewesen ist, machte ich Versuche mit 0,25%iger Kaliumdichromatlösung, die während der ganzen, auf 5–6 Stunden sich erstreckenden Destillation hinzuträufelte.

Ein gewisses Quantum  $\beta$ -Oxybuttersäure wurde mit 600 ccm Wasser verdünnt, mit 7 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und unter Hinzufügung von Chromat auf die angegebene Weise einer Oxydation unterzogen.

Bei den ersten dieser Versuche wurde die gradweise stattfindende Oxydation der  $\beta$ -Oxybuttersäure in Aceton durch Bestimmung des Jodverbrauchs des Destillats nach gewissen Zwischenzeiten untersucht.

1. 84,56 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure (inaktiv) verbrauchten  
 nach 2 Stunden Destillation . . . . 20,4 ccm  $n_{10}$ -Jod  
 > weiteren 2 Stunden Destillation 22,2 > >  
 > einer weiteren Stunde Destillation 0,9 > >

Sa. 46,8 ccm  $n_{10}$ -Jod od. 96% Ausbeute.

2. 84,56 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure (inaktiv) verbrauchten  
 nach 3 Stunden Destillation . . . . 43,2 ccm  $n_{10}$ -Jod  
 > einer weiteren Stunde Destillat. 2,4 ccm >  
 > > > > > 0,5 > >

Sa. 46,1 ccm  $n_{10}$ -Jod od. 94,5% Ausbeute.

3. 84,56 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure (inaktiv) verbrauchten  
 nach 3 Stunden Destillation . . . . 40,8 ccm  $n_{10}$ -Jod  
 > weiteren 2 Stunden Destillation 5,5 > >

Sa. 46,3 ccm  $n_{10}$ -Jod od. 95% Ausbeute.

Der größere Teil der  $\beta$ -Oxybuttersäure zersetzt sich somit nach etwa dreistündiger Destillation. Die letzten Spuren der  $\beta$ -Oxybuttersäure scheinen dagegen eine recht große Widerstandskraft gegen das Oxydationsmittel zu besitzen und fordern folglich eine verhältnismäßig längere Einwirkungszeit. In den Tabellen II und III sind die Resultate dieser Untersuchung im Detail zusammengeführt.

Wie aus der Tabelle II hervorgeht, erhält man nach 5—6stündiger Destillation ein Destillat, das ein 93,6—96% der bei den Versuchen angewendeten Menge  $\beta$ -Oxybuttersäure entsprechendes Quantum Jod oder im Mittel für 9 Bestimmungen 95% verbraucht. Bei den Proben 1—5 wurde eine inaktive synthetische  $\beta$ -Oxybuttersäure angewendet, während in den Proben 6—9 ein Ca-Zn-Salz einer aus Harn dargestellten levogyren Säure zur Anwendung kam. Die Destillation geschah unter kräftigem Kochen, und die verbrauchte Gesamtmenge 0,25%iges Kaliumdichromat betrug über einen Liter, einer Menge von zwischen 2—3 g festem Chromat entsprechend. Nach der angegebenen Zeit wurde die Destillation zum Zwecke der Erhaltung eines neuen, für die Untersuchung auf Aceton nach Frommer-Engfeldt bestimmten Destillates fortgesetzt. Dieses Destillat, das natürlich besonders aufgesammelt wurde, gab bei der Untersuchung eine sehr unbedeutende Reaktion für Aceton, die, der Farbenstärke nach zu urteilen, höchstens einige Hundertstel mg auf 100 ccm gerechnet, betrug. Daß die bei den Versuchen

Tabelle II.

Nr.	$\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Destillat				
		Zeit für die Destilla- tion Stunden	Jod- verbrauch $n_{10}$ -J ccm	Berechn. Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Aus- beute %	Aceton nach From- mer- Engfeldt bei fort- ges. Dest.
1	84,56 (d-l)	5	46,8	81,15	96	0-Spur
2	84,56 ( )	5	46,1	79,94	94,5	•
3	84,56 ( )	5,5	46,3	80,28	95	•
4	84,56 ( )	6	46,6	80,80	95,5	•
5	84,56 ( )	5,5	46,3	80,28	95	•
6	67,09 (l-)	5	37,0	64,16	95,6	•
7	67,09 ( )	6	36,5	63,29	94,3	•
8	67,09 ( )	6	36,2	62,77	93,6	•
9	67,09 ( )	6	36,8	63,81	95,1	•

angewandte  $\beta$ -Oxybuttersäure praktisch vollständig verbraucht war, ging auch daraus hervor, daß bei einer ausgedehnten Destillation keine jodometrisch meßbare Menge Aceton in dem auf die angedeutete Weise erhaltenen Destillat nachweisbar war.

Tabelle III.

Nr.	$\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Dest. I, nach 6stündiger Destillation				Dest. II, nach Redestilla- tion mit NaOH + $H_2O$ ,		
		Jodver- brauch $n_{10}$ -J ccm	Berechn. Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Aus- beute %	Acet. n. From- mer- Eng- feldt bei fortges. Dest.	Jodver- brauch $n_{10}$ -J. ccm	Berechn. Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Aus- beute %
1	6,71	3,6	6,24	93	0	3,4	5,89	87,9
2	16,77	9,1	15,78	94,1	0-Spur	8,4	14,56	86,9
3	33,54	17,8	30,86	92	•	16,4	29,30	87,0
4	67,09	36,8	63,81	95,1	Spur	35,2	61,04	90,9
5	67,09	36,2	62,77	93,6	•	34,7	60,17	89,7
6	67,09	36,5	63,29	94,3	•	34,8	60,34	89,9

In der Tabelle III ist eine Anzahl Analysen angeführt, die auf dieselbe Weise wie die vorhergehenden Analysen ausgeführt worden sind, jedoch mit dem Unterschiede, daß das zuerst erhaltene Destillat mit Wasserstoffsperoxyd in alkalischer Lösung umdestilliert worden ist. Der Jodverbrauch der ersten Destillate entspricht im Mittel einer Ausbeute von etwa 94%, während die nach der Umdestillation erhaltenen im Durchschnitt etwa 89% der theoretisch berechneten Menge verbrauchten. Auch hier tritt somit die schon im Vorhergehenden betonte Verminderung der Ausbeuten nach der Umdestillation mit Alkalisperoxyd hervor. Als Resultat dieser Untersuchung geht also hervor, daß eine Erhöhung der Chromatmenge von der von Shaffer-Marriott angegebenen Menge von 0,5 g auf 2—3 g für jede Destillation die Ausbeute bei der Oxydation reiner  $\beta$ -Oxybuttersäure nicht vermindert, die Erhöhung der Chromatmenge aber andererseits die Oxydation in keinem nennenswerten Grade zu beschleunigen scheint. Zur vollständigen Zersetzung aller  $\beta$ -Oxybuttersäure scheint eine Destillationszeit von 5—6 Stunden erforderlich zu sein. Bei der Oxydation bilden sich außer dem Aceton auch reduzierende, mit dem Alkalisperoxyd entfernbare Substanzen, und die Ausbeute beträgt ungefähr 90%.

#### 4. Die Einwirkung des Traubenzuckers auf das Resultat bei der Oxydation.

##### Vorproben mit Traubenzucker und Schwefelsäure.

1 g Traubenzucker, chemisch rein, Kahlbaum, wurde in 600 ccm Wasser gelöst, mit 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und unter Hinzutröpfeln von Wasser destilliert. Nach dreistündiger Destillation wurde das erhaltene Destillat auf folgende Substanzen und Eigenschaften untersucht.

Reduzierende	Substanz : O-Spuren (Alkali-ammoniak. Silber)
Jodoformbildende	> : O (Lieben)
Aceton	: O-Spuren? (Frommer-Engfeldt)
Jodverbrauch nach Messinger direkt	: 0,8 ccm $n_{10}$ -Jod
"      "      "      "      "	nach Umdestillation mit NaOH
	+ $H_2O_2$ : 0,05 ccm $n_{10}$ -Jod.

Bei der Destillation des Traubenzuckers in schwefelsaurer Lösung bilden sich folglich jodverbrauchende Substanzen in geringer Menge. Diese Substanzen bestehen jedoch kaum aus Aceton und werden durch Umdestillation mit Alkalisuperoxyd beinahe vollständig entfernt.

### Oxydationsversuche mit Traubenzucker.

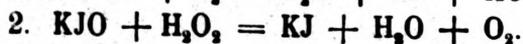
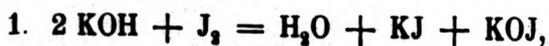
Ein gewisses Quantum Traubenzucker wurde in 600 ccm Wasser gelöst, mit 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und unter Hinzuträufeln von 0,5—1%igem Kaliumdichromat 3—5 Stunden destilliert. Die Destillate wurden teils direkt auf reduzierende Substanz, jodoformbildende Substanz, Aceton und Jodverbrauch sowie teils nach Umdestillation mit  $\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}_2$  auf Jodverbrauch und Aceton untersucht.

Tabelle IV.

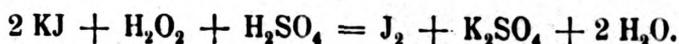
Nr.	Traubenzucker g	Zeit der Destillation	Die Konzentration der Kaliumdichromatlg. %	Destillat I (direkt)				Dest. II, nach Redestillat. m. $\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}_2$	
				Reduzier. Substanz	Jodoformbild. Substanz	Aceton	Jodverbrauch $n/10\text{-J. ccm}$	Aceton	Jodverbrauch $n/10\text{-J. ccm}$
1	0,05	3	0,5	Spur	0	Spur ?	0,50	Spur ?	0,20
2	0,25	3	0,5	+	0	Spur	2,20	Spur	0,40
3	1,00	3	1	+	+ schwach	›	14,6	+	0,50
4	5,00	3	1	+	›	+ schwach	17,2	+	0,80
5	2,00	5	1	+	›	›	33,2	+	1,00

Die in Tabelle IV zusammengeführten Resultate zeigen, daß sich bei der Oxydation beträchtliche Mengen jodverbrauchende Substanzen bilden. Welches diese Substanzen sind, ist nicht der Gegenstand einer eingehenderen Untersuchung gewesen. Mit Hilfe der Frommer-Engfeldtschen Probe ist indessen die Gegenwart von Aceton in minimalen Mengen festgestellt worden. Der schwache Ausschlag für die Liebensche Jodoformprobe — jedoch größer, als daß er ganz dem anwe-

senden Aceton zuzuschreiben ist — deutet wenigstens nicht auf eine größere Menge Acetaldehyd hin, und wahrscheinlich handelt es sich um Ameisensäure. Möge dem indessen sein, wie ihm wolle, sicher ist, daß die bei der Destillation gebildeten Substanzen stark reduzierend und zum allergrößten Teil durch eine Umdestillation mit Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd zu entfernen sind. Der letztere Umstand ist bemerkenswert, da Embden-Schmitz in dieser Beziehung zu einer entgegengesetzten Erfahrung gekommen sind, und Shaffer selbst in seiner letzten Untersuchung unter Aufgabe seiner ersten Ansicht die Richtigkeit des von Embden-Schmitz erhaltenen Resultates zugestanden hat. Diese Widersprüche sind indessen mehr scheinbar als wirklich und lassen sich durch die Annahme, daß die ebengenannten Verfasser eine in dem angewandten Wasserstoffsuperoxyd gewöhnliche und auf das Resultat einwirkende Verunreinigung übersehen haben, erklären. Das im Handel vorkommende verdünnte 3%ige Wasserstoffsuperoxyd ist bekanntlich der Haltbarkeit wegen mit kleinen Mengen gewisser Anilide (Antifebrin, Phenacetin u. a.) versetzt. Bei der Destillation mit Alkali werden diese Substanzen einer partiellen Zersetzung unterworfen, destillieren über (Anilin?) und verbrauchen bei der Behandlung mit Jod und Alkalihydrat gewisse Mengen Jod. Das einzige von mir geprüfte Präparat, das diese störende Verunreinigung nicht enthält und sich für den vorliegenden Zweck brauchbar erwiesen hat, war Mercks 30%iges Perhydrol. Daß auch bei der Destillation selbst eine gewisse Vorsicht zu beobachten ist, so daß unzersetztes Wasserstoffsuperoxyd nicht überdestilliert, verdient vielleicht auch hervorgehoben zu werden. Das Wasserstoffsuperoxyd wirkt nämlich in einem hohen Grade störend auf die Jodtitrierung ein. Behandelt man ein solches wasserstoffsuperoxydhaltiges Destillat mit Alkalihydrat und Jod, so entsteht eine lebhafte Sauerstoffgasentwicklung unter gleichzeitiger Reduktion des Hypojodits in Jodid, wobei die gelbe Farbe der Lösung verschwindet.



Je nach dem Wasserstoffsuperoxydgehalt findet ein größerer oder kleinerer Verbrauch des auf Aceton wirksamen Hypojodits statt, was sich nach Ansäuerung durch Verlust an Jod bei Titrierung mit Thiosulfat zu erkennen gibt. Finden sich so große Mengen Wasserstoffsuperoxyd im Destillat, daß noch nach Verbrauch alles Hyperjodits Wasserstoffsuperoxyd im Überschuß vorhanden ist, so wird andererseits nach dem Ansäuern Jod aus dem vorhandenen Jodid frei:



Als Endresultat bei der Jodtitrierung kann man somit bei der Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd sowohl Verlust wie Überschuß an Jod mit all den zwischen diesen äußersten Grenzen liegenden Möglichkeiten von Wechselwerten erhalten. Eine Verunreinigung des Destillats mit Wasserstoffsuperoxyd muß somit als sehr gefährlich und das Resultat störend betrachtet werden. Eine vollständige Zersetzung des angewandten Wasserstoffsuperoxyds ohne Überdestillation scheint stattzufinden, wenn die alkalische Mischung erst sehr vorsichtig auf etwa  $80^\circ$  erwärmt und dann etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde bei dieser Temperatur erhalten wird, wonach die Wärme erhöht wird, bis die Destillation in Gang kommt. Bei den von mir hier und anderswo ausgeführten Destillationen wurde ein solches Quantum Natronlauge verwendet, daß die Mischung eine Konzentration von 1% hatte, und in bezug auf das Wasserstoffsuperoxyd je nach den Umständen 5—20 ccm verdünntes (3%iges) Perhydrol für jede Destillation anwesend waren. Als Resultat der obigen Untersuchung geht somit hervor, daß bei der Destillation von Traubenzucker mit Chromschwefelsäure große Mengen jodverbrauchende flüchtige Substanzen sich bilden, daß diese aber doch zum allergrößten Teil durch Umdestillation mit Alkalisuperoxyd zu entfernen sind. Von mehr theoretischem Interesse dürfte sein, daß bei der Oxydation eine Acetonbildung in minimalen Mengen möglich zu sein scheint.

Von einem gewissen Interesse dürfte auch das Resultat bei der Oxydation des Fruchtzuckers sein. 2 g Fruchtzucker gaben nach 3stündiger Oxydation ein Destillat, das nicht weniger als 55 ccm  $n/10$ -Jod ver-

brauchte, eine außerordentlich kräftige Acetonreaktion nach Frommer-Engfeldt und auch eine kräftige Jodoformreaktion nach Lieben gab. Nach der Umdestillation mit Alkalisuperoxyd verbrauchte das Destillat 5,2 ccm  $n/10$ -Jod und zeigte anhaltend kräftige Acetonreaktionen. Bei der Oxydation von Fruktose bilden sich somit bedeutend größere Mengen Aceton als bei der Oxydation von Glykose, wo die Acetonbildung eine minimale und nur eben noch nachweisbare ist. In dem verschiedenen Charakter der Fruktose und Glykose als Keton bzw. Aldehyd haben wir wahrscheinlich den Erklärungsgrund für die Verschiedenheit bei der Oxydation zu suchen. Es scheint nämlich ganz wahrscheinlich, daß das Aceton, das selbst ein Keton ist, sich leichter aus einer Ketose als aus einer Aldose bildet. Unter der Voraussetzung, daß die Frommersche Probe mit keinem anderen flüchtigen Körper als mit Aceton Rotfärbung gibt, wäre somit eine Acetonbildung der Kohlenhydrate in vitro bewiesen und folglich im Organismus nicht undenkbar, wenn auch, anderen Verhältnissen nach zu urteilen, wenig wahrscheinlich.

### 5. Die Fällbarkeit des Traubenzuckers in ammoniakalischer Lösung.

Zum Zweck der Entfernung des im Harn vorkommenden Traubenzuckers und anderer Substanzen schlägt Shaffer eine Vorbehandlung mit Bleiessig und Ammoniak vor. Es ist zwar eben bewiesen worden, daß sich bei der Oxydation von Traubenzucker in Wirklichkeit nur solche Substanzen bilden, die ohne Schwierigkeit mit Alkalisuperoxyd zum größten Teil entfernt werden können, die Anwesenheit des Traubenzuckers ist aber doch insofern ein Übelstand, daß die notwendige Chromatmenge sich infolge der großen Reduktionsfähigkeit des Zuckers nur mit Schwierigkeit im voraus berechnen und regeln läßt.

Zur Fällung wendet Shaffer einen nach der Vorschrift der amerikanischen Pharmakopöe<sup>1)</sup> hergestellten Bleiessig und konzentriertes Ammoniak<sup>2)</sup> an. Nach der gegebenen Vorschrift soll zu jedem Volumen Harn im allgemeinen dasselbe Volumen

<sup>1)</sup> 180 g Bleiacetat, 110 g Bleioxyd, etwas Wasser werden im Wasserbad erhitzt, bis das Bleioxyd umgesetzt ist, worauf die Mischung mit Wasser (etwa 1000 g) auf ein Eigengewicht von 1,235 bei 25° C. verdünnt wird.

<sup>2)</sup> Auch auf die Beschaffenheit des Ammoniaks hat man seine Aufmerksamkeit zu richten. Nach einer von mir gleichzeitig mit dieser Arbeit ausgeführten und in der Svensk. Farm. Tidskrift Nr. 14 u. 15 (1916) ver-

Bleiessig und das halbe Volumen Ammoniak genommen werden. Bei geringem (oder keinem) Zuckergehalt können diese Mengen jedoch auf die Hälfte beschränkt werden.

Um zu ermitteln, ob die vorgeschlagenen Quantitäten der Fällungsmittel die geeigneten sind, habe ich eine Serie Untersuchungen teils mit reiner Traubenzuckerlösung und mit normalem Harn und teils mit mit Traubenzucker versetztem Harn ausgeführt. Auf die Einzelheiten bei allen diesen Versuchen einzugehen, halte ich indessen nicht für nötig, sondern will nur in kurzem die Prinzipien angeben, nach denen ich gearbeitet habe. Von Bleiessig und Ammoniak wurden für ein gewisses Volumen Traubenzuckerlösung oder Harn steigende Quantitäten nicht nur in den Verhältnissen  $2 + 1$ , sondern auch in anderen angewendet. Hierauf wurden die Filtrate teils auf das Vorkommen von Fällungsmitteln in Überschuß und teils auf die reduzierende Fähigkeit [mit Fehlingscher Lösung] untersucht. Als Resultat der Versuche hat sich ergeben, daß die von Shaffer vorgeschlagene Proportion zwischen dem Bleiessig und dem Ammoniak von  $2 + 1$  die geeignete war. Dagegen habe ich die von Shaffer angegebene Menge Fällungsmittel — Maximum ein gleiches Volumen Harn und Bleiessig — im allgemeinen als zu klein gefunden. Für die vollständige Fällung normalen Harns hat sich zwar ein ungefähr gleiches Volumen Bleiessig als hinreichend gezeigt, bei der Bearbeitung zuckerhaltigen Harns ist aber, wenn der Zweck der Behandlung erreicht werden soll, eine viel größere Menge von Fällungsmitteln erforderlich. So fordert 1 g Traubenzucker in Wasserlösung zur vollständigen Fällung 20—25 ccm Bleiessig und folglich brauchten 25 ccm eines mit 4% Zucker versetzten Harns eine berechnete Menge von 45—50 ccm Bleiessig. Auch wenn ein pathologischer, 4% Zucker enthaltender Harn mit einer etwas

öffentlichten Untersuchung ist das im Handel vorkommende Ammoniak selten vollständig frei von Aceton. Die Acetonmenge wechselt bedeutend und scheint in einem gewissen direkten proportionellen Verhältnis zur Menge der übrigen als Verunreinigung vorkommenden «Teerprodukte» zu stehen.

geringeren Quantität Bleiessig als die ebengenannte gefällt werden könnte, dürfte gleichwohl die Vorsicht gebieten, daß die Bleiessigmenge nach den obenstehenden Gründen berechnet wird.

Was die für die Fällung nötige Zeit betrifft, so zeigten die für die Beantwortung dieser Frage ausgeführten Versuche solche Schwankungen in den Resultaten, daß ich nicht ohne Zögern die Veröffentlichung derselben vornehme. Zweifellos ist die Ursache der angedeuteten Unregelmäßigkeiten in dem Verhältnis zu suchen, daß der entstandene Niederschlag zuweilen eine größere oder geringere Geneigtheit zeigte, in Kolloidform überzugehen. Hierdurch wurde die Mischung oft äußerst schwer und langsam filtrierbar. Das erhaltene Filtrat war oder wurde in kurzem opalisierend und besaß bei der Untersuchung mit Fehlings Lösung fortdauernd reduzierende Eigenschaften. Dieser Übelstand machte sich in einem besonders hohen Grade geltend, wenn die Fällung bei einer unter  $15^{\circ}$  C. liegenden Temperatur ausgeführt wurde; aber auch wenn die Fällung bei einer höheren Temperatur ausgeführt und die Zeit vor der Filtrierung auf 24 Stunden ausgedehnt wurde, zeigte das Filtrat die obenerwähnten reduzierenden Eigenschaften in einem höheren oder niedrigeren Grade und setzte gewöhnlich nach 12—24 Stunden Verwahrung erneuten Niederschlag ab.

Ich nahm verschiedene Versuche vor, um möglichst einen vollständigen Niederschlag unmittelbar zustande zu bekommen. So versuchte ich einen Zusatz von verdünnter Eisenchloridlösung in der Hoffnung, daß das entstandene Eisenhydrat das kolloidale Bleisaccharat mit sich reißen würde, jedoch ohne einen nennenswerten Erfolg. Dagegen zeigte sich ein Zusatz von Alaunlösung recht vorteilhaft, obgleich das erhaltene Filtrat nach einiger Zeit auch hier Neigung zeigte, erneuten Niederschlag abzusetzen. Als Resultat dieser Versuche ergibt sich doch, daß das letzte Verfahren das zuverlässigste Resultat gibt. Der Sicherheit wegen wurde das Filtrat nach 12—24 Stunden Verwahrung umfiltriert, falls es nach der genannten Zeit einen Niederschlag abgetzt hatte oder sich als nicht vollständig klar

erwies. Diese Filtrierung ist, wenn die Lösung vorsichtig ohne Umschütteln direkt auf dem Filtrum dekantiert wird, in einigen Minuten bewerkstelligt.

1 g Traubenzucker, 150 ccm Wasser, 25 ccm Bleiessig, 12,5 ccm 25 %iges Ammoniak und 5 ccm 10 %ige Alaunlösung wurden umgeschüttelt und mit Wasser auf 250 ccm verdünnt und nach 15 Minuten filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde dann über Nacht in Ruhe gelassen und hierauf durch ein Filtrum vorsichtig dekantiert. Das auf diese Weise erhaltene vollständig klare Filtrat wurde nach Rupp-Lehmann<sup>1)</sup> auf die Menge reduzierende Substanz untersucht, und es ergab sich, daß diese auf 125 ccm eine mit 1,5 ccm  $n/10$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  äquivalente Menge Glykose, oder 5—6 mg, betrug. Bei der Destillation des Filtrates in schwefelsauer Lösung mit 0,5 %igem Kaliumdichromat während 3 Stunden erhielt ich ein Destillat, das 0,70—0,80 ccm  $n/10$ -Jod bei direkter Titrierung, und nach der Umdestillation mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd 0,10—0,15 ccm  $n/10$ -Jod, also sehr unbedeutende Quantitäten, verbrauchte.

Bei der Fällung zuckerhaltigen Harns dürfte folgender Berechnungsgrund anzuwenden sein.

Auf je 1 ccm Harn nehme man 1 ccm Bleiessig (Pharm. U. S. A.) und außerdem für je ein im Harn befindliches Gramm Traubenzucker weitere 25 ccm Bleiessig sowie von Ammoniak (25 %) ein dem halben Volumen der ganzen angewendeten Bleiessigmenge entsprechendes Volumen. Außerdem setze man auf je 100 ccm Bleiessig 20 ccm 10 %ige Alaunlösung hinzu, worauf man die Mischung mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen verdünnt, umschüttelt und nach 15—30 Minuten filtriert. Das Filtrat soll über Nacht stehen, worauf ein gewisser Teil desselben vorsichtig durch ein Filtrum dekantiert wird.

---

<sup>1)</sup> Rupp-Lehmann, Apoth.-Zeitg., Bd. 24, S. 73 (1909).

## 6. Untersuchung normalen Harns mit und ohne Zusatz von Traubenzucker.

25—100 ccm Harn mit oder ohne Zusatz von Traubenzucker wurden mit Bleiessig, Ammoniak und Alaun in dem oben angegebenen Verhältnis gefällt, mit Wasser auf 500 ccm verdünnt und nach 15—30 Minuten filtriert, über Nacht verwahrt und durch ein Filtrum dekantiert, bis man etwa 250 ccm vollständig klares Filtrat erhalten hatte. 250 ccm des Filtrats wurden neutralisiert und mit einem Überschuß von etwa 7 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt, mit Wasser auf 600 ccm verdünnt und etwa 20 Minuten der Destillation unterworfen. (Tabelle V.) Hierauf wurde die Destillation unter Hinzutropfen von 0,25 %igem Kaliumdichromat (unter Beibehaltung des ungefähren ursprünglichen Volumens) 5 Stunden fortgesetzt (Dest. B.), die Destillation zur Erhaltung einer geringeren Menge neuen Destillates eine kürzere Zeit fortgesetzt (Dest. C.) und schließlich das Dest. B. mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd umdestilliert (Dest. D.). Die verschiedenen Destillate wurden auf reduzierende Substanzen (Alkali-ammoniakal. Silber), Phenole (Millons Reagens), Aceton (Frommer-Engfeldt), Jodverbrauch (Messinger) untersucht. Das Dest. A. enthielt, wie erwartet, außer Aceton auch reduzierende Substanzen und Phenole und folglich repräsentiert der Jodverbrauch sämtliche dieser Körper. Derselbe beträgt mindestens 0,65 ccm und höchstens 1,5 ccm mit ungefähr 0,9 ccm als Durchschnitt für 8 Bestimmungen, alles auf 100 ccm Harn berechnet. Als Resultat einer auf kolorimetrischem Wege ausgeführten Untersuchung<sup>1)</sup> ist hervorgegangen, daß der normale Acetongehalt im Harn eine so geringe Menge ausmacht, daß von diesen 0,9 ccm nur 0,2—0,3 als durch Aceton verbraucht betrachtet werden können. Für gewöhnliche Bestimmungen des Acetongehaltes im Harn kann dieser jedoch ohne Ungelegenheit direkt aus dem Jodverbrauch berechnet werden, denn jene 0,6—0,7 ccm  $n_{10}$ -Jod, womit die Werte für den Acetongehalt sich vermehren, können, falls es sich nicht um Analysen handelt, bei denen aus besonderen Gründen

<sup>1)</sup> Engfeldt, Berlin. Klin. Wochenschr., Nr. 31, 1915.

Tabelle V.

Nr.	Probe	Tagesmenge Harn ccm	Zugesetzte Menge Traubenzucker %	Dest. A.				Dest. B.		Dest. C.		Dest. D.	
				Reduzierende Substanz	Phenole	Aceton	Jodverbrauch auf Harn $n/10$ -J ccm	Reduzierende Substanz	Aceton	Jodverbrauch auf Harn $n/10$ -J ccm	Aceton	Jodverbrauch auf Harn $n/10$ -J ccm	Berechn. Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure a. 100 ccm mg
1	Mann 25 Jahre	1370	0	+	+	+	0,65	+	+	Spur	+	2,5	4,33
2	„ 25 „	1370	1	+	+	+	0,80	+	+	„	+	2,2	3,81
3	„ 35 „	1350	0	+	+	+	0,90	+	+	„	+	2,8	4,86
4	„ 35 „	1350	1	+	+	+	0,80	+	+	„	+	3,1	5,37
5	„ 35 „	1350	4	+	+	+	0,75	+	+	„	+	3,5	6,07
6	„ 35 „	1350	8	+	+	+	1,20	+	+	„	+	3,6	6,24
7	„ 56 „	1560	0	+	+	+	1,50	+	+	„	+	3,2	5,55
8	„ 36 „	1450	0	+	+	+	0,85	+	+	„	+	2,5	4,33

eine besonders große Genauigkeit erforderlich ist, ruhig mitberechnet werden. Shaffers Vorschlag, die Phenole und die reduzierenden Substanzen durch eine Umdestillation mit Natronlauge zu entfernen, ist zwar als ziemlich effektiv<sup>1)</sup> zu betrachten, andererseits scheint aber der praktische Vorteil der Anwendung des Vorschlages im großen ganzen ein geringer oder gar keiner zu sein.

Das Dest. B. enthält sowohl reduzierende Substanzen wie Aceton. Woher das Aceton stammt, läßt sich für den Augenblick nicht mit absoluter Bestimmtheit sagen, es sieht jedoch nicht so unwahrscheinlich aus, daß es durch im Harn normal vorkommende kleine Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure gebildet wird. Der Jodverbrauch des Destillates beträgt mindestens 6,1 und höchstens 7,4 ccm  $n_{10}$ -Jod, mit im Durchschnitt 6,7 ccm für 8 Bestimmungen. Nach der Umdestillation mit Alkalisuperoxyd sinkt indessen der Jodverbrauch auf 2,2, 3,6 und 2,9 ccm, entsprechend 3,81, 6,24 und 5,07 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure auf 100 ccm Harn. Setzt man die Destillation mit Chromatschwefelsäure über die 5 Stunden fort, so erhält man indessen ein Destillat, das andauernd einen zwar schwachen, aber doch wahrnehmbaren positiven Ausschlag für Aceton nach Frommer-Engfeldt gibt. Während der 5 Stunden langen Oxydation wird folglich nicht alle im Harn befindliche acetonbildende Substanz vollständig verbraucht. Berücksichtigen wir außerdem, daß die Oxydation an sich nicht vollständig quantitativ verläuft, so könnten wir daraus den Schluß ziehen, daß, falls das Aceton ausschließlich von der  $\beta$ -Oxybuttersäure herrührt, die Menge dieser Säure Quantitäten betragen sollte, die die hier erhaltenen Werte in Wirklichkeit in einem höheren oder geringeren Grade übersteigen. Eine spätere, weiterhin zu behandelnde Untersuchung hat nämlich Werte der  $\beta$ -Oxybuttersäure als Resultat gegeben, die nahezu das Doppelte der hier erhaltenen betragen.

Shaffer-Marriott haben eine ähnliche Untersuchung mit einem in gewissen Beziehungen von den von mir erhaltenen recht bedeutend abweichenden Resultat ausgeführt.

<sup>1)</sup> Sämtliche reduzierende Substanzen werden jedoch nicht entfernt.

Normaler Harn teils ohne und teils mit 3% Traubenzucker wurde nach der Fällung mit Bleiessig und Ammoniak der Destillation unter Hinzutröpfeln von Kaliumdichromat unterworfen, und dann der Jodverbrauch in den Destillaten bestimmt. Derselbe betrug, ohne nennenswerte Schwankungen, 3 ccm  $n/10$ -Jod, auf 100 ccm Harn gerechnet, somit ungefähr die Hälfte meiner Werte. Da ich indessen bei der Oxydation 5 Stunden, Shaffer-Marriott aber wahrscheinlich nur  $3\frac{1}{2}$  angewendet haben, so kann diese Verschiedenheit in der Ausführung der Bestimmungen sehr wohl die Abweichungen in den Resultaten erklären. Bemerkenswert ist indessen, daß Shaffer-Marriott nach der — nur mit den von zuckerhaltigem Harn erhaltenen Destillaten ausgeführten — Umdestillation mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd Werte für den Jodverbrauch gefunden haben, die eher auf eine Zunahme als auf eine Abnahme desselben hindeuten. Bei meinen Versuchen ist indessen der Jodverbrauch nach der Umdestillation konstant auf ungefähr die Hälfte gesunken. Ich wage hier, wie bei ähnlichen vorher beschriebenen Fällen die Annahme, daß die Ursache der hohen Werte Shaffer-Marriotts Verunreinigungen in dem verwandten Wasserstoffsperoxyd zuzuschreiben sind.

#### **B. Versuche zur Erzielung einer quantitativen Ausbeute durch Detailveränderungen der Shaffer-Marriottschen Methode.**

Schon im Vorhergehenden habe ich betont, daß Cooke und Gorslin (l. c.) gewisse Abänderungen der Shafferschen Methode für die Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn vorgeschlagen haben, die nach den Verfassern vorteilhaft auf die Resultate einwirken. Analysen, die beweisen, daß eine quantitative Ausbeute erzielt worden ist, werden jedoch nicht angeführt. Die vorgeschlagenen Abänderungen erscheinen im großen ganzen bedeutungslos, inwiefern sie nicht, wie z. B. die Beschränkung der Chromatmenge, uns eher eine Verminderung der Ausbeute vermuten lassen.

Folin und Denis<sup>1)</sup> haben bei einer von ihnen vorgeschlagenen nephelometrischen Methode zur Bestimmung des Acetons und der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn mit sehr geringen Quantitäten  $\beta$ -Oxybuttersäure gearbeitet und dabei gefunden, daß unter gewissen, genau angegebenen Bedingungen eine quantitative Ausbeute in Aceton stattfindet. Die Verf. haben bei der Ausarbeitung ihrer Methode als Material ein von Shaffer erhaltenes reines Ca-Zn-Salz angewendet und gefunden, daß es nicht nötig ist, das Chromat in Gemäßheit der Shafferschen Vorschrift allmählich hinzuzusetzen, sondern daß ein Zusatz auf einmal ohne Gefahr stattfinden kann. Für die Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn geben sie die folgende Vorschrift. Ein Quantum verdünnter, eine berechnete Gesamtmenge von 2—4 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure enthaltender Harn wird mit 200 ccm Wasser und 5 ccm 10%iger Schwefelsäure gemischt, diese Mischung wird dann 10 Minuten gekocht, so daß das vorhandene Aceton und die Acetessigsäure entfernt werden. Die Mischung wird hierauf auf einmal mit 25 ccm einer 2% Kaliumdichromat und 35% Schwefelsäure enthaltenden Lösung versetzt und 40—60 Min. einer vorsichtigen Destillation unterworfen. Zur Vermeidung von Acetonverlust während der Destillation soll die Mischung nach Vorschrift der Verf. schnell bis zum Kochpunkt erhitzt und die Flamme dann so vermindert werden, daß die Destillation beinahe aufhört. Diese vorsichtige Erhitzung wird ungefähr 40 Minuten lang fortgesetzt, die Flamme dann von neuem vermehrt und die Mischung ungefähr 15 Minuten lang einer kräftigen Destillation unterworfen. Nicht mehr als 80—125 ccm Destillat dürfen in der angegebenen Zeit übergehen. Das Destillat wird in einem ungefähr 75—100 ccm kaltes Wasser enthaltenden Kjeldahl-Kolben aufgesammelt. Während der Destillation soll die Spitze des Kühlers, zur Vermeidung von Acetonverlust, unter die Oberfläche des Wassers in der Vorlage reichen. Dem Destillat werden einige Gramm Natriumsuperoxyd beigelegt und die Destillation wird erneuert, bis ungefähr 80 ccm überdestilliert haben. Eine vorhergehende Fällung des Harns mit Bleiessig

<sup>1)</sup> Folin und Denis, Journ. of biol. Chem., Bd. 18, S. 268 (1914).

haben die Verf. für unnötig gefunden, da die von dem eventuell anwesenden Zucker gebildete jodverbrauchende Substanz bei der Umdestillation vollständig entfernt wird. Im Falle der Harn zuckerfrei ist, ist nach Ansicht der Verf. keine Umdestillation des ersten Destillates erforderlich. Das auf die eine oder andere Weise erhaltene Enddestillat wird auf 100 ccm verdünnt und der Acetongehalt dann mittels Scott-Wilsons Reagens (alkalisches Mercuricyanid und Silbernitrat), das mit dem Aceton einen unlöslichen fein verteilten Niederschlag bildet, auf nephelometrischem Wege bestimmt.

Zum Zwecke der Kontrollierung des von den Verf. über die Ausbeute des Acetons bei der Oxydation gemachten Angaben machte ich eine Serie Versuche mit Wasserlösungen kleiner Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) in genauer Übereinstimmung mit den angegebenen Vorschriften; eine Redestillation mit Alkalisuperoxyd wurde jedoch nicht ausgeführt. Der Jodverbrauch der Destillate wurde nach Messinger bestimmt. Zur Erhaltung genauer Resultate wandte ich bei den Versuchen besonders fein kalibrierte Büretten an. Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengefaßt und ergeben, daß die Ausbeute eine sehr unvorteilhafte ist. Die für die Destillation vorgeschlagene Zeit ist allzu knapp, um eine vollständige Zersetzung der anwesenden  $\beta$ -Oxybuttersäure zu erreichen, was vollständig aus dem Umstände hervorgeht, daß man bei fortgesetzter Destillation ein Destillat erhält, das eine deutliche Reaktion für Aceton nach Frommer-Engfeldt gibt und gewisse Quantitäten Jod verbraucht. Die Ausbeuten bei direkter Titration der Destillate geben Werte, die zwischen 80,0 und 75%, im Durchschnitt für 6 Bestimmungen 78%, wechseln. Der gesamte Jodverbrauch nach  $1\frac{3}{4}$  Stunden Oxydation entsprach einer Ausbeute von im Durchschnitt 88%, somit eine Zunahme von nicht weniger als 10% im Verhältnis zu der nach Folin-Denis erhaltenen. Die Ausbeuten sind jedoch selbst unter den zuletzt angeführten Bedingungen keineswegs quantitativ. Eine Umdestillation mit Alkalisuperoxyd trägt ganz sicher zu einer weiteren Verschlechterung der Resultate bei. Wir haben nämlich keinen Grund zu der Annahme, daß sich nicht hier,

Tabelle VI.

Nr.	β-Oxy- buttersäure  mg	Nach 1 stündiger Destillation			Nach weiterer <sup>3</sup> / <sub>4</sub> stünd. Destillation		Gesamt- ausbeute nach 1 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Std.  %
		Jodver- brauch  n/10-J ccm	Berechn. Menge β-Oxy- buttersäure  mg	Aus- beute  %	Aceton nach From- mer- Engfeldt	Jodver- brauch  n/10-J ccm	
1	4,73	2,10	3,64	77	+	0,25	86
2	4,73	2,05	3,55	75	+	0,35	88
3	2,37	1,05	1,82	77	+	0,15	88
4	2,37	1,05	1,82	77	+	0,20	91
5	2,37	1,10	1,90	80,5	+	0,10	88
6	2,37	1,10	1,90	80,5	+	0,10	88

ebenso wie es bei den Makroanalysen der Fall war, gleichzeitig mit dem Aceton auch andere, mit Alkalisuperoxyd zerlegbare, jodverbrauchende Substanzen bei der Oxydation bildeten. Eine nähere Untersuchung der Folin-Denisschen nephelometrischen β-Oxybuttersäurebestimmungsmethode liegt nicht im Plane dieser Arbeit, doch kann ich nicht unterlassen, auf Grund der vorher erwähnten Analysen meine Zweifel an der Korrektheit derselben auszusprechen. Die vorgeschlagene Art für die Oxydation der β-Oxybuttersäure gibt, auch bei ausgedehnter Destillation, so schlechte Ausbeuten, daß hieraus deutlich hervorgeht, daß man das Ziel — eine quantitative Ausbeute — auf diesem Wege nicht erreicht.

Die Versuche, die ich selbst zur Erreichung dieses Zieles ausgeführt habe, haben leider so unbefriedigende Resultate ergeben, daß ein eingehenderer Bericht über diese von geringem Interesse ist. Ich will deshalb nur in allergrößter Kürze die Beobachtungen, die ich bei diesen recht weitläufigen Versuchen gemacht habe, mitteilen, in der Hoffnung, daß die Resultate möglicherweise für den, der eine weitere Bearbeitung dieses Gebietes beabsichtigt, einen gewissen Wert haben können.

Die Oxydation ist in sowohl alkalischer wie saurer Lösung ausgeführt worden. Die Oxydationsversuche in alkalischer

Lösung (Wasserstoffsperoxyd, Kaliumpermanganat) sind insoweit von Interesse, als eine Acetonbildung hierbei nicht zustande kam. Ob die  $\beta$ -Oxybuttersäure bei diesen Versuchen von den Oxydationsmitteln beeinflusst worden ist oder nicht, habe ich nicht näher untersucht. Denkbar ist jedoch, daß dies der Fall gewesen ist, daß aber die primär gebildete Acetessigsäure infolge des anwesenden Alkalis dann ausschließlich unter Bildung von Essigsäure zersetzt worden ist (Säurespaltung). Was die Versuche in saurer Lösung betrifft, so habe ich schon im Vorhergehenden gezeigt, daß die Ausbeuten sich bessern, wenn bei der Oxydation mit Chromschwefelsäure die Zeit auf 5—6 Stunden ausgedehnt wird. Die Ausbeuten werden jedoch selbst unter diesen Verhältnissen nicht quantitativ, und vor allem bildet sich bei der Oxydation mit Chromsäure nicht allein Aceton, sondern es bilden sich auch andere flüchtige, jodverbrauchende Substanzen, was auf eine in verschiedenen Richtungen verlaufende Zersetzung der  $\beta$ -Oxybuttersäure hindeutet. Außer mit Chrom habe ich auch Versuche mit anderen Oxydationsmitteln, wie Wasserstoffsperoxyd, Kaliumpermanganat, Ammoniumpersulfat u. a., gemacht, die sich sämtlich als schlechter als die von Shaffer vorgeschlagene Chromsäure erwiesen haben. Zum Zwecke einer möglichen Verbesserung der Resultate bei der Oxydation habe ich Versuche mit Zusatz gewisser, eine katalytische Wirkung besitzender Stoffe, wie Eisen-, Kupfer-, Silber-, Gold- und Platinsalze, gemacht, jedoch ohne nennenswerten Erfolg. Von den versuchten Oxydationsmitteln zeigte sich das Wasserstoffsperoxyd auch aus dem Grunde weniger geeignet, weil dasselbe bei der Destillation in unzersetzter Form teilweise in das Destillat übergeht und somit eine direkte jodometrische Bestimmung des gebildeten Acetons unmöglich macht. Das Ammoniumpersulfat in stark verdünnter Form gab verhältnismäßig gute Werte (etwa 85%), es zeigte sich jedoch, daß das Destillat bedeutend mehr reduzierende Substanzen enthält, als bei der Anwendung von Chromsäure als Oxydationsmittel. Der Umtausch der Schwefelsäure mit anderen Säuren, beispielsweise Phosphorsäure, verschlechtert die Ausbeuten noch

mehr, und als Endresultat aller dieser Versuche ging hervor, daß die Chromatschwefelsäure weitaus das vorteilhafteste Oxydationsmittel ist.

Meine Versuche, bei der Oxydation der  $\beta$ -Oxybuttersäure eine vollständig quantitative Ausbeute in Aceton zu erzielen, haben folglich nicht zu dem gewünschten Resultat geführt.

### C. Klinische Methoden zur Bestimmung des Gesamtacetons und der $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn.

#### 1. Versuche mit reinen $\beta$ -Oxybuttersäurelösungen.

Schon im Vorhergehenden habe ich das Ansprechende in Shaffers Idee, sämtliche Acetonkörper des Harns in einer einzigen Folge und auf gleichartige Weise zu bestimmen, hervorgehoben. Daß Shaffer-Marriott indessen in ihren Versuchen zur Verwirklichung ihrer Idee nicht sehr glücklich gewesen sind, dürfte ebenfalls aus der vorliegenden Untersuchung deutlich hervorgegangen sein. Die Ausbeuten haben in den von mir nach dieser Methode gemachten Versuchen ungefähr 80% betragen und müssen deshalb, um einigermaßen richtig zu werden, um nicht weniger als 25% vermehrt werden. Berücksichtigen wir indessen, daß je nach der Menge des bei der Bestimmung anwesenden Ammoniumsulfates große Schwankungen in den Ausbeuten zu erwarten sind, so können selbstverständlich nicht einmal die eben genannten Prozentzahlen einer zuverlässigen Schätzung des wirklichen  $\beta$ -Oxybuttersäuregehaltes zugrunde gelegt werden. Ein Umstand, der bei der Bewertung der Shaffer-Marriottschen  $\beta$ -Oxybuttersäurebestimmungsmethode ebenfalls in Betracht zu ziehen ist, ist die beträchtliche Zeit, die für die Ausführung der Bestimmung erforderlich ist. Abgesehen von der Vorbehandlung des Harnes mit Bleiessig nimmt die Verfolgung der Methode zusammen 5 Stunden in Anspruch und hierbei sollen nicht weniger als 4 Destillationen stattfinden, die eine beinahe ununterbrochene Überwachung erfordern. Wenn somit die Methode auch, was indessen keineswegs der Fall ist, befriedigende Resultate lieferte, würde sie doch in-

Tabelle VII.

Nr.	$\beta$ -Oxy-	Jodverbrauch	Berechnete	Ausbeute
	buttersäure		Menge	
	mg	$n_{10}$ -J ccm	$\beta$ -Oxybutter- säure mg	%
1	6,71	3,20	5,55	82,8
2	16,77	8,05	13,96	83,2
3	33,54	15,90	27,57	82,2
4	67,09	32,25	55,42	83,3
5	67,09	31,75	55,05	82,0
6	134,18	64,50	111,84	83,3

folge der angeführten mühseligen Ausführungsweise kaum eine allgemeine Anwendung erhalten können. Der Mangel an einer für klinische Zwecke geeigneten Methode zur Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn hat mich indessen zu Versuchen veranlaßt, ein zur Erreichung dieses Zieles geeignetes Verfahren auf empirischem Wege zu finden. Die Methode zur Bestimmung der Oxybuttersäure im Harn, über die ich jetzt berichten will, ist eine Modifikation der Shafferschen und gründet sich auf folgende von mir gemachte Beobachtungen. Wird eine in 600 ccm Wasser gelöste und mit 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuerte  $\beta$ -Oxybuttersäure auf einmal mit 50 ccm einer 2,5 g Kaliumdichromat und 5 g konzentrierte Schwefelsäure enthaltenden Lösung versetzt und  $1\frac{1}{2}$  Stunden lang einer so kräftigen Destillation unterworfen, daß nach dieser Zeit etwa 75 ccm zurückbleiben, so erhält man ein Destillat, das im Durchschnitt eine 82,8% der anwesenden  $\beta$ -Oxybuttersäure entsprechende Quantität Jod verbraucht. Wie aus der Tabelle VII hervorgeht, sind die Ausbeuten auch bei Versuchen mit wechselnden Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure befriedigend. Bei fortgesetzter Destillation über die angegebene Zeit hinaus zeigt das neue Destillat keine oder eine höchst unbedeutende Reaktion für Aceton nach Frommer-Engfeldt, was darauf hindeutet, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure faktisch vollständig verbraucht worden ist. Die

jodverbrauchenden Substanzen bestehen zum allergrößten Teil aus Aceton, aber auch Stoffe mit reduzierenden Eigenschaften ließen sich nachweisen. Die Zersetzung der  $\beta$ -Oxybuttersäure scheint indessen unter den angegebenen Bedingungen auf eine gewisse konstante Weise stattzufinden. Da die Ausbeuten im Mittel 82,8% betragen, entsprechen folglich je 1 ccm verbrauchtes  $n_{-10}$  Jod  $\frac{1,734 \cdot 100}{82,8} = 2,094$  oder ungefähr 2,1 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure.

## 2. Anwendung der Methode auf den Harn.

### a) Versuche mit normalem Harn.

Normaler Harn mit oder ohne Zusatz von Traubenzucker wurde erst einer Fällung mit Bleiessig, Ammoniak und Alaun nach den folgenden, schon im Vorhergehenden angegebenen Berechnungsgründen unterworfen.

20 ccm zuckerfreier Harn wurden mit 200 ccm Wasser gemischt und mit 20 ccm Bleiessig (Pharm. U. S. A.), 10 ccm konzentriertem Ammoniak (acetonfrei) und 4 ccm 10%iger Alaunlösung gemischt und diese Lösung dann auf 500 ccm verdünnt und nach etwa 30 Minuten filtriert. Das Filtrat mußte über Nacht stehen, worauf 250 ccm desselben vorsichtig durch ein Filtrum dekantiert wurden. Im Falle der Harn mit Traubenzucker versetzt war, wurde die Bleiessigmenge für jedes in der verwendeten Harnmenge befindliche Gramm Zucker um 25 ccm erhöht, und vom Ammoniak wurde die Hälfte, von der 10%igen Alaunlösung 20% der gesamten Bleiessigmenge angewendet.

Zu 250 ccm des auf die angegebene Weise erhaltenen Filtrates wurden 350 ccm Wasser und eine  $\frac{1}{6}$  des bei dem Fällen angewandten Ammoniaks entsprechende Anzahl Kubikzentimeter konzentrierte Schwefelsäure und außerdem 2 ccm im Überschuß hinzugesetzt. Die Mischung wurde dann nach Zusatz einer Messerspitze Talk 20 Minuten zur Entfernung und eventuellen Bestimmung des im Harn befindlichen Acetons und der Acetessigsäure destilliert, hierauf wurden auf einmal

durch Scheidetrichter 50 ccm der obengenannten Chromat-schwefelsäure hinzugesetzt und die Destillation wurde dann unter kräftigem Kochen etwa 1 $\frac{1}{2}$  Stunde oder bis 75 ccm zurückblieben, fortgesetzt. In dem erhaltenen letzten Destillat wurde der Jodverbrauch nach Messinger bestimmt. Derselbe betrug in 9 untersuchten Fällen, von denen 4 mit Traubenzucker (2— $\frac{1}{4}$ %) versetzt waren, mit geringen Schwankungen im Mittel 0,6 ccm  $n_{10}$ -Jod, auf 100 ccm Harn somit 6 ccm  $n_{10}$ -Jod.

b) Versuche mit normalem, mit Traubenzucker und  $\beta$ -Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) in wechselnden Mengen versetztem Harn.

20 ccm des bei diesen Versuchen angewendeten Harnes verbrauchten nach der Oxydation 1,2 ccm  $n_{10}$ -Jod. 20 ccm des ebengenannten Harnes wurden mit wechselnden Mengen Traubenzucker und  $\beta$ -Oxybuttersäure versetzt und auf die vorher beschriebene Weise behandelt. In dem erhaltenen letzten Destillat wurde der Jodverbrauch nach Messinger bestimmt. Der erhaltene Wert wurde zur Erhaltung des  $\beta$ -Oxybuttersäuregehaltes verdoppelt und um 1,2 ccm vermindert sowie mit 2,1 multipliziert (s. S. 208). Die Resultate gehen aus untenstehender Tabelle VIII hervor.

Tabelle VIII.

Nr.	Zucker g	$\beta$ -Oxy- butter- säure mg	Jodver- brauch n. Ab- zug v. 1,2 ccm $n_{10}$ -J ccm	Berechnete Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure mg	Ausbeute %
1	0,40	6,71	3,2	6,72	100,1
2	0,50	134,18	64,8	136,08	101,4
3	1,00	67,09	32,8	68,88	102,7
4	1,00	33,54	16,0	33,60	100,2
5	2,00	201,27	90,8	190,68	94,7
6	2,00	201,27	88,2	185,22	92,0
7	3,00	134,18	55,8	117,18	87,3

Bei der Umrechnung der vorhergehenden Tabelle, die Zuckermenge in Grammprozenten und die  $\beta$ -Oxybuttersäuremenge in Milligrammprozenten ausgedrückt, erhält man folgende Werte:

Nr.	Zucker g ‰	$\beta$ -Oxybuttersäure mg ‰	Ausbeute ‰
1	2	67,09	100,1
2	2,5	670,90	101,4
3	5	335,45	102,7
4	5	167,70	100,2
5	10	1006,35	94,7
6	10	1006,35	92
7	15	670,90	87,3

Die drei letzten Versuche zeigen einen relativ hohen Verlustprozentsatz. Bei diesen war der Zuckergehalt verhältnismäßig groß, nämlich 10—15 ‰, und demzufolge wurde zur Fällung eine entsprechend größere Menge Bleiessig und Ammoniak angewendet. Infolgedessen fand sich bei diesen Proben eine verhältnismäßig große Konzentration von Ammoniumsulfat vor, das, wie vorher bewiesen ist, eine herabsetzende Einwirkung auf die Oxydationsfähigkeit der Chromsäure ausübt. Bei den zuletzt erwähnten Proben erhielt ich bei fortgesetzter Destillation ein stark acetonhaltiges Destillat, obschon die erste Destillation so weit getrieben worden war, daß kaum mehr als 50 ccm zurückblieben. Um dem Einfluß des Ammoniumsulfates entgegenzuwirken, nahm ich deshalb Versuche mit einer Erhöhung der Menge der Chromsäuremischung vor. Diese Versuche fanden unter Verhältnissen statt, die in der Hauptsache mit den ebenerwähnten übereinstimmten, jedoch mit dem Unterschied, daß nach 1 Stunde Destillation weitere 50 ccm Chromsäuremischung hinzugesetzt wurden. Die Destillation wurde auch fortgesetzt, bis nur etwa 75 ccm verblieben, was eine Zeit von insgesamt  $1\frac{3}{4}$ —2 Stunden in Anspruch nahm. Um indessen den Einfluß festzustellen, den das abgeänderte Verfahren auf den normalen Jodverbrauch des Harns hat, wurde

Tabelle IX.

Nr.	Probe	Jodverbrauch auf 10 ccm Harn nach 20 Minuten Destillation in schwefelsaurer Lös.	Jodverbrauch auf 10 ccm Harn nach 1 $\frac{3}{4}$ Stunden Oxydation
		$n_{/10}$ -J ccm	$n_{/10}$ -J ccm
1	Mann 36 Jahre	0,15	1,20
2	» 26 »	0,10	1,25
3	Knabe 6 »	0,10	1,15
4	» 2,5 »	0,15	1,05
5	Mann 36 »	0,10	1,25
6	Frau 32 »	0,15	1,15
7	» 24 »	0,15	1,20
8	Mann 58 »	0,15	1,20
9	» 28 »	0,15	1,25
10	» 36 »	0,10	1,25

eine Serie Untersuchungen des normalen Harnes vorgenommen. Hierbei wurde auch der Jodverbrauch im ersten Destillat bestimmt (Gesamtaceton). Die Resultate sind in der obenstehenden Tabelle IX zusammengeführt.

Die jodverbrauchenden Substanzen bestehen, wie schon im Vorhergehenden näher geschildert ist, sowohl aus Aceton und Phenolen wie aus reduzierenden Substanzen. Die Menge der letzteren Körper macht indessen so geringe Beträge aus, daß ihre Anwesenheit keinen eigentlichen Einfluß auf die Resultate bei der Berechnung des sogenannten Gesamtacetongehaltes in pathologischem Harn ausüben kann. Das bei der Oxydation erhaltene Destillat verbrauchte im Durchschnitt 1,2 ccm  $n_{/10}$ -Jod oder das Doppelte von dem bei den vorhergehenden Versuchen. Das Destillat enthält außer dem Aceton auch reduzierende Substanzen. Durch Umdestillation mit Wasserstoffsperoxyd in alkalischer Lösung können die letzteren entfernt werden. Hierbei sinkt der Jodverbrauch recht beträchtlich, in 2 untersuchten Fällen auf 0,55 und 0,45 ccm, was auf 100 ccm Harn im Durchschnitt 5 ccm

Tabelle X.

Nr.	Zucker g	$\beta$ -Oxy- butter- säure mg	Jodver- brauch n. Ab- zug v. 2,4 ccm $n/10$ -J ccm	Berechnete Menge $\beta$ -Oxybutter- säure mg	Ausbeute %
1	0,5	67,09	32,6	68,46	102,0
2	0,5	54,27	25,8	54,39	100,2
3	0,5	54,27	25,2	52,93	97,5
4	0,5	108,54	52,4	110,04	101,4
5	0,5	217,08	104,4	219,24	101,0
6	1,0	54,27	25,7	53,97	99,5
7	1,0	54,27	25,4	53,34	98,3
8	1,0	108,54	51,6	108,36	99,8
9	1,0	217,08	103,2	216,72	99,9
10	2,0	54,27	25,4	53,34	98,3
11	2,0	108,54	52,2	109,62	101,0
12	2,0	217,08	104,4	219,24	101,0
13	2,0	108,54	51,4	107,94	99,4
14	2,0	217,08	104,2	218,82	100,8

betragen würde. Bei kolorimetrischer Untersuchung nach Frommer-Engfeldt (l. c.) erhält man eine der auf jodometrischem Wege gefundenen Acetonmenge gut entsprechende Farbenstärke. Die mit Stütze dieser Analysen berechneten Werte für den normalen  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt im Harn betragen etwa 100 mg auf das Liter und übersteigen um nahezu 100% die durch Oxydation bei konstantem Volumen früher von mir erhaltenen. Da es indessen nicht als genügend bestätigt betrachtet werden kann, daß das bei der Oxydation erhaltene Aceton seinen Ursprung ausschließlich von der  $\beta$ -Oxybuttersäure herleitet, habe ich bei der Anwendung der Methode an pathologischem Harn die erhaltenen Werte für den Jodverbrauch um 1,2 ccm vermindert, indem ich diesen Jodverbrauch als den für normalen Harn wahrscheinlichen annahm. Das zuletzt angeführte Verfahren mit Zusatz von Chromschwefelsäure in 2 Portionen wurde dann auf mit wechselnden Mengen Trauben-

zucker und  $\beta$ -Oxybuttersäure versetzten Harn angewendet. Für jeden Versuch wurden 20 ccm eines Harnes verwendet, der nach den Ergebnissen bei direkten Versuchen 2,4 ccm  $n/_{10}$ -Jod verbrauchte. Der gefundene Jodverbrauch wurde um diesen Betrag vermindert und der  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt dann durch Multiplikation mit dem Faktor 2,1 umgerechnet (s. S. 208). Die in der Tabelle X zusammengeführten Resultate geben überraschend gute und gleichmäßige Werte. Bei der Umrechnung der obenstehenden Tabelle, mit der Zuckermenge in Grammprozenten und die  $\beta$ -Oxybuttersäuremenge in Milligrammprozenten ausgedrückt, erhielt ich folgende Werte:

Nr.	Zucker g %	$\beta$ -Oxybuttersäure- menge mg %	Ausbeute %
1	2,5	335,45	102
2	2,5	271,35	100,2
3	2,5	271,35	97,5
4	2,5	542,70	101,4
5	2,5	1085,40	101
6	5	271,35	99,5
7	5	271,35	98,3
8	5	542,70	99,8
9	5	1085,40	99,9
10	10	271,35	98,3
11	10	542,70	101
12	10	1085,40	101
13	10	542,70	99,4
14	10	1085,40	100,8

### 3. Bestimmung des Gesamtacetons und der $\beta$ -Oxybuttersäure in pathologischem Harn nach der von mir modifizierten Shaffermethode.

In Übereinstimmung mit dem zuletzt angeführten Verfahren zur Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure führte ich eine Serie Untersuchungen an vom Serafimerlazarett und vom Sabbatsberg-Krankenhaus in Stockholm erhaltenem patho-

logischen Harn aus. Der im ersten Destillat erhaltene Jodverbrauch wurde ohne Korrektion auf Aceton durch Multiplikation mit 0,967 umgerechnet, während die im zweiten Destillat nach der Oxydation gefundene Menge verbrauchten Jodes um 1,2 ccm (normaler Jodverbrauch des Harnes) vermindert und dann mit 2,1 multipliziert wurde. Die erhaltenen Werte, die den Aceton-, bzw.  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt in Milligramm auf 10 ccm Harn angeben, wurden darauf in Gramm auf 1 Liter Harn ausgerechnet. Die Resultate sind in der Tabelle XI zusammengeführt. Die größten Mengen Gesamtaceton und  $\beta$ -Oxybuttersäure betragen 1,595 bzw. 14,049 g pro Liter. Die Tagesmengen 7,18 und 56,70 g. Die Proportionen zwischen dem Aceton und der  $\beta$ -Oxybuttersäure weisen, wie ersichtlich ist, große Schwankungen auf. In den Fällen, wo die Acetonkörper in einer größeren Menge auftreten, beträgt das Gesamtaceton  $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{20}$  der  $\beta$ -Oxybuttersäuremenge,  $\frac{1}{8}$ — $\frac{1}{10}$  scheint jedoch das gewöhnliche Verhältnis zu sein. In den Fällen, wo die Menge der «Acetonkörper» verhältnismäßig gering ist, tritt dagegen der Unterschied zwischen dem Gesamtaceton und der  $\beta$ -Oxybuttersäuremenge weniger scharf hervor. Berechnet man sowohl das Gesamtaceton wie die  $\beta$ -Oxybuttersäure als Acetessigsäure, so können die erhaltenen Werte zusammenaddiert werden und wir erhalten folglich einen einzigen Zahlenwert für den Gehalt des Harns an «Acetonkörpern». Untersuchen wir das Verhältnis zwischen dem ebenerwähnten Zahlenwert und dem totalen Jodverbrauch der Harndestillate näher, so finden wir, daß zwischen diesen beiden Zahlen eine interessante und bemerkenswert einfache Relation zu bestehen scheint. Verdoppelt man nämlich die den totalen Jodverbrauch des Harnes angegebende Zahl, so zeigt sich, daß man eine Zahl erhält, die den Ziffernwert des totalen Gehalts des Harnes an «Acetonkörpern», als Acetessigsäure berechnet, ziemlich gut angibt. Diese Umstände scheinen mir von nicht geringer praktischer Bedeutung und der Ausnutzung wert zu sein, besonders da hierdurch ein vereinfachtes und zeitersparendes Verfahren zur Bestimmung sämtlicher «Acetonkörper» des Harns in einer einzigen Operation zu gewinnen ist. Eine

Tabelle XI.

Nr.	Probe	Harn		1. Destillat		2. Destillat		Harn						
		Tages- menge	Spez. Gew.	Zucker	%	Jod- verbrauch	Be- rechn.	Jod- verbrauch	Be- rechn.	Tages- menge	Tages- menge	Gesamt- menge	Gesamt- verbrauch	Aus der Acidosisjodzahl berechnete Menge «Gesamtacet- essigsäure» g pro L.
						auf 10 ccm Harn	Menge Total- acetone	auf 10 ccm Harn	Menge $\beta$ -Oxy- buttersäure					
1	24. 5. 16. Frau	4500	1,014		1,35	14,7	1,420	41,2	8,652	6,39	38,93	10,984	57,1	55,7 · 0,2 = 11,14
2	25. 5. 16. »	4500	1,020		2,2	16,5	1,595	60,0	12,600	7,18	56,70	15,153	77,7	76,3 · 0,2 = 15,26
3	26. 5. 16. »	4750	1,027		4,4	8,5	0,822	29,1	6,111	3,90	29,03	7,434	38,8	37,4 · 0,2 = 7,48
4	27. 5. 16. »	4000	1,029		5,3	6,6	0,638	30,3	6,363	2,55	25,45	7,358	38,1	36,7 · 0,2 = 7,34
5	28. 5. 16. »	7500	1,035		7,2	4,2	0,406	19,55	4,105	3,04	30,79	4,737	24,95	23,55 · 0,2 = 4,71
6	25. 10. 16. Mann	2300	1,026		Spur	1,95	0,188	1,3	0,273	0,43	0,63	0,599	4,45	3,05 · 0,2 = 0,61
7	2. 11. 16. »	1600	1,023		0,6	2,2	0,213	2,5	0,525	0,48	0,84	0,889	5,9	4,5 · 0,2 = 0,90
8	11. 11. 16. »	1750	1,030		3,8	3,2	0,309	9,2	1,932	0,54	3,38	2,437	14,2	12,8 · 0,2 = 2,56
9	20. 11. 16. »	3710	1,031		5,2	7,45	0,720	30,8	6,468	2,67	24,00	7,605	39,45	38,5 · 0,2 = 7,61
10	11. 9. 16. Frau	—	1,021		3,1	7,1	0,690	66,9	14,049	—	—	14,975	75,2	73,8 · 0,2 = 14,76
11	16. 9. 16. »	—	1,017		2,4	13,1	1,270	47,4	9,954	—	—	11,962	61,7	60,3 · 0,2 = 12,06
12	16. 12. 16. Mann	2940	1,031		4,8	8,3	0,803	39,0	8,190	2,36	24,08	9,437	48,5	47,3 · 0,2 = 9,46
13	22. 12. 16. »	2430	1,028		4,1	6,9	0,687	23,8	4,998	1,67	12,15	6,071	31,9	30,5 · 0,2 = 6,10
14	23. 12. 16. »	2270	1,027		3,6	4,4	0,425	12,8	2,688	0,97	6,10	3,382	18,4	17 · 0,2 = 3,40

besondere Destillation zur Isolierung von schon vom Anfang im Harn befindlichen Aceton und Acetessigsäure braucht somit nicht stattzufinden, sondern die ersten 50 ccm Dichromat-schwefelsäure werden unmittelbar, nachdem die Flüssigkeit ins Kochen gekommen ist, hinzugesetzt, worauf die Destillation auf die angegebene Weise fortgesetzt wird. Wir bekommen sonach ein einziges Destillat, in welchem der Jodverbrauch unmittelbar bestimmt werden kann. Durch dieses Verfahren wird die Zeit für die Destillation beschränkt, wozu noch kommt, daß nur eine Titrierung vorgenommen zu werden braucht.

Da die Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen erscheint, daß die Chromsäuremischung das im Harn schon vom Anfang befindliche Aceton angreifen und Anlaß zur Säurespaltung der ebenfalls im Harn befindlichen Acetessigsäure geben könnte, machte ich Destillationsversuche mit reinem Aceton- und Acetessigsäurelösungen, teils mit und teils ohne Chromatzusatz. Bei diesen Versuchen verbrauchten die erhaltenen Destillate genau dieselben Mengen Jod, was deutlich beweist, daß das Chromat keinen Einfluß auf die erwähnten Körper ausübt.

Alle diese Versuche mit sowohl normalem wie pathologischem Harn sind, unabhängig von der vorhandenen Menge «Acetonkörper», mit 10 ccm ausgeführt worden. Normaler Harn verbraucht nach der Destillation und Oxydation eine Gesamtmenge Jod, die man mit geringen Schwankungen auf etwa 1,40 ccm (s. S. 211) setzen kann. Bei der Gegenwart von Aceton und nahe verwandten Körpern in pathologischem Harn steigt der Jodverbrauch in einem höheren oder geringeren Grade über den ebengenannten Betrag. Der Jodverbrauch bildet mit anderen Worten ein Maß für den Gehalt des Harnes an «Acetonkörpern». Ich möchte aus diesem Anlaß vorschlagen, daß den auf die angegebene Weise enthaltenen «Jodzahlen» der Name «Acidosisjodzahlen» beigelegt wird. Unter Acidosisjodzahlen verstehe ich folglich die Anzahl Kubikzentimeter  $n/10$ -Jod, die 10 ccm Harn unter gewissen genau angegebenen Analysenverhältnissen verbrauchen. Wird die erhaltene «Acidosisjodzahl» um den normalen Jodverbrauch des Harnes, also 1,4, vermindert, so erhält man eine Zahl, die, verdoppelt, in Milli-

gramm den Gehalt des Harnes an «Acetonkörpern», als Acetessigsäure gerechnet, angibt. Bei der Berechnung des «Gesamtacetessigsäuregehaltes» pro Liter vermindert man die «Acidosisjodzahl» wie vorher um 1,4, multipliziert sie aber mit 0,2 und erhält dann die Menge in Gramm.

#### 4. Vergleichende Untersuchung der Resultate bei der Bestimmung von $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn nach der Polarisations- und Oxydationsmethode.

Behufs noch weiterer Kontrolle der bei der Anwendung der Oxydationsmethode auf pathologischen Harn erhaltenen Ausbeuten führte ich eine Serie Untersuchungen aus, wobei ich neben der Oxydationsmethode auch die Polarisationsmethode benutzte. Bei der Wahl des Verfahrens für die Extraktion des Harnes mit Äther entschied ich mich aus technischen Gründen für die von Black<sup>1)</sup> angegebene. Die Extraktionszeit wurde jedoch bedeutend über die von dem erwähnten Verfasser vorgeschriebene, nämlich bis auf 15—25 Stunden, ausgedehnt. Im übrigen verfuhr ich auf folgende Weise. 200 ccm Harn wurden mit Natroncarbonat alkalisiert und vorsichtig im Wasserbad zur Konsistenz des Sirups abgedampft, erkalten gelassen, mit 25%iger Schwefelsäure angesäuert, mit gebranntem Gips gemischt und bis zum Tage nachher steif werden gelassen. Die Masse, die sich im allgemeinen äußerst leicht in einem Porzellanmörser in Pulver zerreiben ließ, wurde hierauf 15—25 Stunden in einem gewöhnlichen Soxhlet-Apparat extrahiert. Bei der Extraktion wurde konstant eine braunfarbige, in Äther schwer lösliche Substanz mitgerissen, die vor der Abdunstung des Äthers durch Filtrierung aus dem Ätherextrakt entfernt wurde. Zur Vermeidung von Anhydridbildung fand die Abdunstung nach Zusatz einiger Kubikzentimeter destillierten Wassers und unter äußerst vorsichtiger Erhitzung im Wasserbade statt. Der Ätherrückstand wurde auf 20—25 ccm verdünnt, mit einer geringen Menge Tierkohle und Talk versetzt, filtriert und in 2 dm-Röhren polarisiert. Um bei der

<sup>1)</sup> Black, Journal of Biol. Chemistry, Bd. 5, S. 207 (1908).

Tabelle XII.

Nr.	Spez. Gew.	Zucker %	Gesamt- Aceton g pr. L.	β-Oxybuttersäure					
				Nach der Oxydations- methode g pr. L.	Nach der Polarisationsmethode				
					Extraktions- zeit Std.	Menge des Wasserex- traktes ccm	Abgelesene Drehung im 2 dm-Rohr Grad	Aus der Drehung be- rechnete Menge β-Oxy- butters. g pr. L.	Aus- beute im Ver- hältnis zur oxy- dimetri- schen %
1	1,021	3,1	0,690	14,049	25	25	— 5,10	13,215	94,1
2	1,017	2,4	1,270	9,954	15	25	— 3,70	9,587	96,3
3	1,026	Spur	0,188	0,273	15	15	— 0,20 (1 dm)	0,623	228,0
4	1,023	0,6	0,213	0,525	15	20	— 0,45	0,930	177,0
5	1,030	3,8	0,309	1,932	15	20	— 0,90	1,866	96,6
6	1,031	5,2	0,720	6,468	20	21	— 2,80	6,094	94,2
7	1,031	4,8	0,803	8,190	20	20	— 3,70	7,670	93,6
8	1,028	4,1	0,687	4,998	24	20	— 2,30	4,768	95,4
9	1,027	3,6	0,425	2,730	24	20	— 1,30	2,694	98,7

Polarisation subjektive Irrtümer zu vermeiden, ließ ich die von mir beobachtete Drehung durch eine andere Person kontrollieren. Die erhaltenen Werte wurden in Gramm pro Liter Harn umgerechnet. Die Resultate sind in der Tabelle XII zusammenggeführt, die auch die bei der Oxydation erhaltenen anführt. Bevor ich zu einer näheren Prüfung und Beurteilung der erhaltenen Resultate übergehe, möchte ich noch einmal an die Erfahrungen erinnern, die Shaffer-Marriott bei Versuchen zur polarimetrischen Bestimmung der β-Oxybuttersäure nach der Extraktion nach Black gesammelt haben. Die bei diesen Versuchen ausgeführten Bestimmungen von β-Oxybuttersäurelösungen von bekannter Stärke ergeben, daß von der β-Oxybuttersäure nicht mehr als etwa 90% wiederzufinden sind. Andererseits enthält jedoch der Harn außer β-Oxybuttersäure auch andere ätherlösliche levogyre Substanzen, die den bei der Extraktion konstatierten Verlust bis zu einem gewissen Grad ausgleichen. Bei der Bearbeitung normalen

oder schwach  $\beta$ -oxybuttersäurehaltigen Harns erhält man ein Extrakt, dessen Drehungsfähigkeit in einem nicht unwesentlichen Grade durch die Anwesenheit dieser fremden levogyren Körper bedingt wird. Bei Anwendung der Polarisationsmethode auf einen solchen Harn erhält man folglich Werte der  $\beta$ -Oxybuttersäure, die die wirklichen in einem höheren oder geringeren Grade übersteigen.  $\beta$ -Oxybuttersäure in nicht allzu kleiner Menge enthaltender Harn gibt dagegen erfahrungsgemäß verhältnismäßig richtige Werte, indem die obengenannten fremden levogyren Körper den bei der Extraktion konstatierten Verlust an  $\beta$ -Oxybuttersäure vollständig oder teilweise aufwiegen. Berücksichtigen wir bei der Beurteilung der von mir bei den polarimetrischen Bestimmungen der  $\beta$ -Oxybuttersäure erhaltenen Resultate diese Umstände gebührend, so scheint eine genügende Stütze für die Annahme vorhanden zu sein, daß die erhaltenen Werte mit den wirklichen recht gut übereinstimmen, obschon die letzteren wahrscheinlich in der Regel etwas höher sind. Dies gilt jedoch nicht für die Proben Nr. 3 und 4, die nur geringe Mengen  $\beta$ -Oxybuttersäure enthalten, und wo aus eben angeführten Gründen die erhaltenen Werte die wirklichen ganz beträchtlich übersteigen.

Vergleichen wir die durch die Oxydation erhaltenen Werte der  $\beta$ -Oxybuttersäure mit den polarimetrischen, so finden wir, daß zwischen ihnen eine befriedigende Übereinstimmung herrscht. Dies gilt jedoch nicht für die Proben 3 und 4, wo die durch die Oxydation gefundenen Resultate nur etwa die Hälfte der aus der Polarisation berechneten bilden. Die bei der Polarisationsmethode erhaltenen Resultate bilden, mit den durch die Oxydationsmethode erhaltenen verglichen, niedrigstens 93,6 und höchstens 98,7% der letzteren mit einem Durchschnitt von 95,6% für 7 Bestimmungen. Die von mir vorgeschlagene Oxydationsmethode zur Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure scheint somit im Mittel eine ungefähr 5% höhere Ausbeute zu geben, als die polarimetrischen nach Black. Aus Gründen, die aus dem eben Angeführten hervorgehen, scheint jedoch bei der Anwendung der zuletzt genannten Methode ein gewisser Verlust wahrscheinlich zu sein. Als Endresultat der

ausgeführten Untersuchungen geht somit hervor, daß die von mir vorgeschlagene Oxydationsmethode auch bei einem Vergleich mit den bei der Polarisationsmethode erhaltenen Resultaten befriedigende Ausbeuten gibt.

### Zusammenfassung.

1. Die von Shaffer-Marriott gelieferten Vorschriften zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn haben sich bei der Prüfung als unbefriedigend erwiesen.

2. Die von mir ausgeführten Versuche, bei der Oxydation der  $\beta$ -Oxybuttersäure eine quantitative Ausbeute zu gewinnen, sind nicht mit Erfolg gekrönt gewesen.

3. Dagegen hat ein auf empirischem Wege gefundenes Verfahren zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure zur Ausarbeitung zweier für klinische Zwecke bestimmter Methoden zur Bestimmung des Gehaltes des Harnes an «Acetonkörpern» geführt, und zwar teils einer Methode für getrennte Bestimmungen des Gesamtacetons und der  $\beta$ -Oxybuttersäure, und teils einer Methode zur gemeinsamen Bestimmung aller «Acetonkörper» des Harnes, als Acetessigsäure gerechnet.

Die Bestimmungen werden nach folgenden Detailvorschriften ausgeführt.

### Apparate und Lösungen.

#### Apparate.

Destillationsapparat nach umstehender Skizze.

Meßkolben zu 500 und 250 ccm.

Meßcylinder zu 50 und 100 ccm, sowie einer zu 1000 ccm mit Pfropfen.

Pipetten und Büretten, sowie Erlenmeyer-Kolben von geeigneter Größe für die Titrierungen.

#### Lösungen.

Bleiessig (Ph. U. S. A.): 180 g, Bleiacetat + 110 g Bleioxyd + Wasser (etwa 1000) im Eigengewicht von 1,235 bei 25° C.

Ammoniak, 25%ig, acetonfrei.

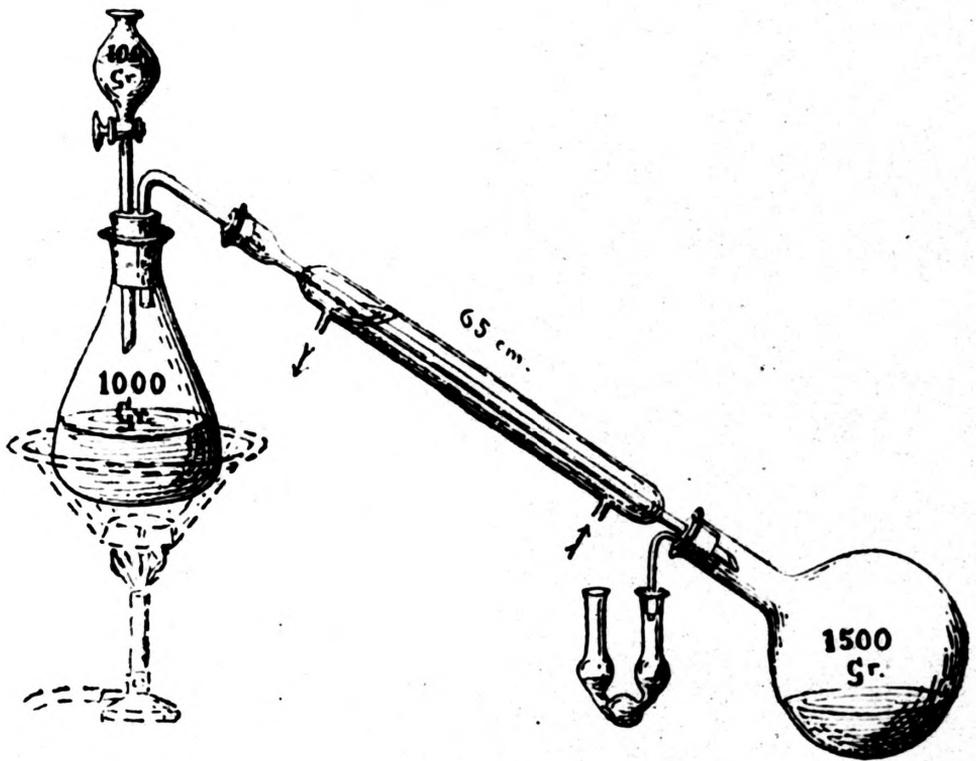
Alaunlösung 10%ig.

Talk.

Schwefelsäure, konz. rein.

Schwefelsäure, 25 % ig, rein.

Chromatschwefelsäure : 5 g Kaliumdichromat, 10 g Schwefelsäure, 95 g Wasser.



### Die Vorbehandlung des Harnes.

20 ccm Harn, 200 ccm Wasser werden mit Bleiessig, Ammoniak und Alaun nach folgenden Berechnungsgründen gefällt.

Zu 20 ccm Harn werden 20 ccm Bleiessig und außerdem zu je einem in den 20 ccm befindlichen Gramm Traubenzucker weitere 25 ccm gesetzt. Hierauf wird von dem 25 % igen Ammoniak ein der Hälfte und von der 10 % igen Alaunlösung ein einem Fünftel der Gesamtmenge des angewendeten Bleiessigs entsprechendes Volumen zugesetzt (z. B. zu einem Harn enthaltend 5 % Zucker : 45 ccm Bleiessig, 22,5 ccm Ammoniak und 9 ccm Alaun); die Mischung wird mit Wasser auf 500 ccm verdünnt, umgeschüttelt und durch ein großes Filtrum nach 15–30 Minuten filtriert, wird über Nacht stehen gelassen, und dann wird vorsichtig, ohne Umschütteln, so viel des

Filtrates durch ein Filtrum dekantiert, daß man ein neues, vollständig klares Filtrat von 250 ccm erhält.

### Ausführung der Bestimmungen.

#### A. Getrennte Bestimmungen des Gesamtacetons und der $\beta$ -Oxybuttersäure.

250 ccm des Filtrates werden mit 350 ccm Wasser verdünnt, mit einigen Gramm Talk versetzt sowie mit konzentrierter Schwefelsäure, ein ungefähr  $\frac{1}{6}$  der bei der Fällung angewandten Ammoniakmenge entsprechendes Quantum und außerdem 2 ccm im Überschuß, angesäuert (z. B. angewandtes Ammoniak 22,5 ccm : konzentrierte Schwefelsäure ungefähr : 6 ccm). Die Mischung wird 20 Minuten der Destillation unterzogen und der Jodverbrauch im Destillat nach Messinger bestimmt. Die Anzahl verbrauchte Kubikzentimeter  $n/_{10}$ -Jod werden mit 0,967 multipliziert und man erhält dann den Gesamtacetongehalt in Gramm pro Liter. Nach Erneuerung der Vorlage werden der Destillationsflüssigkeit von dem Scheidetrichter auf einmal 50 ccm Chromatschwefelsäure zugesetzt, worauf die Destillation unter kräftigem Kochen eine Stunde fortgesetzt wird, worauf noch 50 ccm Chromatschwefelsäure zugesetzt werden. Hierauf wird die Destillation fortgesetzt, bis etwa 75 ccm im Destillationskolben verbleiben. Die ganze Destillation ist so zu regeln, daß sie in ungefähr  $1\frac{3}{4}$  Stunden bewerkstelligt ist. Vorlage und Peligotsröhre werden vor den Destillationen mit einer passenden Menge kalten Wassers — etwa 100 ccm — versetzt und die Abkühlung wird durch reichlichen Zufluß von Kühlwasser sichergestellt.

Das bei der Oxydation erhaltene Destillat wird auf ein bestimmtes Volumen verdünnt, wonach der Jodverbrauch in dem ganzen oder in einem geeigneten Teile desselben nach Messinger bestimmt wird. Der auf 10 ccm Harn berechnete Jodverbrauch wird um 1,2 ccm (den normalen des Harns) vermindert und mit 0,21 multipliziert, wodurch man den  $\beta$ -Oxybuttersäuregehalt in Gramm pro Liter erhält.

**B. Bestimmung sämtlicher «Acetonkörper» des Harns, berechnet als Acetessigsäure.**

250 ccm des auf die angegebene Weise nach der Bleiessigbehandlung erhaltenen Filtrates werden mit 300 ccm Wasser verdünnt und mit Schwefelsäure in den angegebenen Verhältnissen angesäuert, mit Talk versetzt und der Destillation unterworfen. Sobald dieselbe in Gang gekommen ist, werden vom Scheidetrichter 50 ccm Chromatschwefelsäure zugesetzt. Nach einstündiger kräftiger Destillation werden weitere 50 ccm Chromatschwefelsäure zugesetzt, worauf die Destillation noch  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden, oder bis ungefähr 75 ccm im Destillationskolben verbleiben, fortgesetzt wird. Zur Vermeidung von Acetonverlust wende man die vorher angegebenen Vorsichtsmaßregeln betreffend Vorlage, Peligotsröhre und Abkühlung an.

Das erhaltene Destillat wird auf ein bestimmtes Volumen verdünnt, worauf der Jodverbrauch in dem ganzen oder in einem geeigneten Teile desselben nach Messinger bestimmt wird. Der Jodverbrauch, auf 10 ccm Harn berechnet — «Acidosisjodzahl» — wird um 1,4 (den normalen des Harnes) vermindert und mit 0,2 multipliziert, wodurch man die totale Menge der «Acetonkörper», als Acetessigsäure berechnet, in Gramm pro Liter erhält.

---