

**Bemerkungen zu der von Emil Lenk beschriebenen «Methode zur quantitativen Bestimmung der Acetonkörper im Harn»<sup>1)</sup> nebst Vorschlag einer abgeänderten Methodik zur getrennten Bestimmung des Acetons und der Acetessigsäure im Harn.**

Von

**N. O. Engfeldt, Laborator.**

---

(Aus dem physiol.-chem. Institut der tierärztlichen Hochschule zu Stockholm.)  
(Der Redaktion zugegangen am 22. Mai 1917.)

---

Der Titel der Arbeit des obenerwähnten Verfassers erweckt zweifellos die Vorstellung, daß sämtliche «Acetonkörper» des Harnes, somit auch die quantitativ wichtigste, nämlich die  $\beta$ -Oxybuttersäure der Gegenstand der Bearbeitung gewesen seien. Dies ist indessen nicht der Fall. Lenk hält sich ausschließlich beim Aceton und der Acetessigsäure auf, und das Resultat seiner Arbeit ist eine Methode zu getrennten Bestimmungen dieser beiden Körper. Der Verfasser gründet seine Methode auf die von ihm gemachte interessante Beobachtung, daß beim Kochen mit Permanganat in schwach essigsaurer Lösung das Aceton nicht angegriffen wird, während die Acetessigsäure der sog. Säurespaltung unterliegt. Aus der Differenz zwischen dem Gesamtacetongehalt (der Summe des präformierten und des aus der Acetessigsäure erhaltenen Acetons) und dem nach der Zerstörung der Acetessigsäure auf die angedeutete Weise erhaltenen Wert des präformierten Acetons geht der Acetessigsäuregehalt hervor.

Die vom Verfasser ausgearbeitete Methodik zur Ausführung der Bestimmung hat sich indessen bei näherer Prüfung als mit

---

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 78, S. 224 (1916).

so ernsten Mängeln behaftet erwiesen, daß eine Berichtigung derselben vonnöten zu sein scheint.

Der Verfasser betont, daß er sich zur Aufgabe gemacht hat, zur Bestimmung des Acetons und der Acetessigsäure die Destillation des Harns dadurch zu umgehen, daß die jodbindenden, nicht Aceton liefernden Substanzen zerstört werden. Am besten hat sich das Kaliumpermanganat in saurer Lösung bewährt. Als Säure wurde zuerst Schwefelsäure genommen. Der Harn wurde mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung unter Rückflußkühlung gekocht, dann Oxalsäure bis zur Entfärbung zugegeben, die erkaltete Lösung alkalisch gemacht, das Manganhydrat abfiltriert und das Filtrat mit  $n/10$ -Jodlösung versetzt, und schließlich der Jodverbrauch durch Titrierung mit Thiosulfat bestimmt. Niemals war bei hinreichender Menge von Permanganat, auch wenn der Harn Traubenzucker enthielt, Jod verbraucht worden.

Dem, der die Zusammensetzung des Harns einigermaßen kennt und auf diesem Gebiete gearbeitet hat, erscheint diese Behauptung des Verfassers wenig wahrscheinlich.

In welcher Konzentration das Permanganat und die Schwefelsäure bei obenstehenden Versuchen zur Wirkung gekommen sind, geht im übrigen nicht aus dem Berichte des Verfassers hervor. Ich habe jedoch die Annahme gewagt, daß Verfasser im Anschluß an die von ihm später gegebene Vorschrift für die Ausführung der Bestimmung im Harn gearbeitet hat.

Bei den Versuchen, welche von mir sowohl mit normalem Harn wie mit solchem, dem gewisse Quantitäten Traubenzucker zugesetzt waren, ausgeführt wurden, bin ich zu einem ganz anderen Resultat, als dem vom Verfasser angegebenen, gekommen. In untenstehenden Versuchen, wo auf 10 ccm Harn 50 ccm  $n/1$ - $KMnO_4$  und 1 ccm konzentrierte  $H_2SO_4$  zur Anwendung gekommen sind, ist bei normalem Harn ein Jodverbrauch von nahezu 2 ccm  $n/10$ -Jod festgestellt worden. Bei Anwesenheit von 2,5% Traubenzucker steigt der Jodverbrauch auf etwa 6 ccm. Erhöht man die Schwefelsäuremenge auf 2 ccm, so scheint der Jodverbrauch eher zu- als abzunehmen. Bei dem letzteren Versuch war der Schlußpunkt bei der Ti-

trierung außerdem nicht scharf markiert, weil sich bei dem Versuch wahrscheinlich freies Chlor gebildet hat.<sup>1)</sup>

1. 10 ccm Harn + 10 ccm  $n/1$ -KMnO<sub>4</sub> + 1 ccm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden 20 Minuten unter Rückfluß gekocht, vorsichtig mit Oxalsäurelösung entfärbt, mit 20 ccm 20%igem NaOH gefällt, filtriert, Jodverbrauch: 1,8 ccm  $n/10$ -Jod.
2. Wie bei 1, Jodverbrauch: 1,6 ccm  $n/10$ -Jod.
3. > > 1, mit 2 ccm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Jodverbrauch: 2,00 ccm  $n/10$ -Jod.
4. > > 1, mit 0,25 g Traubenzucker und 1 ccm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Jodverbrauch: 6,1 ccm.
5. Wie bei 4, Jodverbrauch: 5,7 ccm.

Der Verfasser betont ferner, daß die Acetessigsäure bei Behandlung mit Permanganat und Schwefelsäure glatt in Aceton übergeht. Diese Angabe ist, wie ich weiterhin zeigen werde, fehlerhaft oder wenigstens nicht ganz richtig. Dagegen scheint die Angabe, daß das Aceton von Permanganatschwefelsäure angegriffen wird, richtig zu sein.

Zur Nachweisung des letzteren Verhältnisses habe ich aus Gründen, die aus dem Folgenden hervorgehen werden, eine von der des Verfassers etwas abweichende Methodik angewendet. So wurde die Acetonlösung<sup>2)</sup> von bekannter Stärke erst unter Rückfluß 20 Minuten behandelt, dann vollständig abgekühlt und nach geeigneter Verdünnung mit Wasser einer 20 Minuten langen Destillation (unter genügenden Vorsichtsmaßregeln gegen Acetonverlust) unterworfen. In den erhaltenen Destillaten wurde der Jodverbrauch nach Messinger nach 15 Minuten Einwirkung bestimmt. In 5 Versuchen mit einer Acetonlösung, die bei direkter Untersuchung 9,6 ccm  $n/10$ -Jod verbrauchte, fanden sich 6,9, 7,6, 7,6, 7,2 und 8,2 ccm. Bei der Behandlung mit Permanganat und Schwefelsäure scheint somit ein wechselnder wie auch beträchtlicher Acetonverlust einzutreten. Ob der Acetonverlust der Bildung von Mesitylen (wie Lenk behauptet) oder von anderen Substanzen zuzuschreiben ist, läßt sich natürlich nicht ohne nähere Untersuchung

<sup>1)</sup> Bei der Destillation entstand wenigstens ein Destillat, das Jod aus Jodkalium entband. Es ist wahrscheinlich, daß Chlor durch die oxydierende Einwirkung des Permanganates aus dem Chlornatrium des Harns entstanden ist.

<sup>2)</sup> Durch Destillation über Permanganat gelöst.

feststellen. Mesitylen bildet sich zwar bei der Behandlung des Acetons mit konzentrierter Schwefelsäure, der Reaktionsverlauf selbst ist aber als eine Anhydridisierung zu betrachten, und es läßt sich schwer denken, daß eine solche Reaktion bei, im Verhältnis zu der vorhandenen Wassermenge, so kleinen Mengen Schwefelsäure, wie sie hier in Frage kommen, zustande kommen kann. Beim Kochen einer Acetonlösung mit Schwefelsäure unter Rückfluß in einer Konzentration bis zu 15% war eine Einwirkung auf das Aceton nicht zu konstatieren. Nach der Destillation verbrauchten die erhaltenen Destillate wenigstens den bei den Versuchen angewendeten Acetonquantitäten entsprechende Jodmengen. Irgendwelchen Beweis dafür, daß sich bei der Behandlung des Acetons mit Permanganatschwefelsäure wirklich Mesitylen bildet, führt der Verfasser überhaupt nicht an.

Beim Kochen von Acetonharn mit Permanganat in essigsaurer Lösung hat Lenk dagegen gefunden, daß das Aceton intakt verbleibt, daß die Acetessigsäure der sog. Säurespaltung unterliegt und daß die im Harn vorkommenden anderen jodverbrauchenden Substanzen vollständig zerstört werden.

Die zur Kontrolle dieser Angaben von mir ausgeführten Versuche haben die Richtigkeit derselben im großen ganzen, insoweit es sich um das Aceton und die Acetessigsäure handelt, bestätigt. Dagegen hat sich gezeigt, daß die Permanganatbehandlung des Harnes, offenbar durch Einwirkung auf andere Harnbestandteile, die Entstehung einer Menge jodverbrauchender Substanzen veranlaßt, die in einem bedenklichen Grade störend auf das Resultat einwirken.

Besonders ist dies der Fall, wenn der Harn, was, wie bekannt, bei Acidosis das gewöhnlichste ist, Traubenzucker enthält.

Die Einwirkung der Permanganatessigsäure auf das Aceton.

Bei der Untersuchung der Einwirkung der Permanganatessigsäure auf das Aceton wandte ich das eben bei der Untersuchung der Einwirkung der Permanganatschwefelsäure angeführte Verfahren an. In 6 untersuchten Fällen mit einer Acetonlösung, die bei direkter Titrierung 9,6 ccm  $n_{10}$ -Jod



verbrauchte, zeigten die Destillate einen Jodverbrauch von 9,2, 9,4, 9,2, 9,5, 9,3, 9,2 ccm. Die wiedergefundenen Mengen sind zwar etwas geringer, als die bei den Versuchen angewendeten, die Ausbeute muß aber doch als befriedigend betrachtet werden und gibt keinen augenscheinlichen Grund für die Annahme, daß das Aceton bei der Behandlung mit Permanganatessigsäure in einem nennenswerten Grade angegriffen wird.

Führt man indessen den obenstehenden Versuch in voller Übereinstimmung mit dem Vorschlage des Verfassers aus, d. h. bewerkstelligt man die Titrierung direkt in der Flüssigkeit, nachdem dieselbe mit Oxalsäure entfärbt und das Mangansalz mit Natronlauge gefällt worden ist, so tritt als Resultat ein Verlust von Aceton, in der Regel in einem beträchtlichen Grade, ein. Die Ursache des Acetonverlustes liegt, wie nähere Untersuchungen gezeigt haben, in der Oxalsäurebehandlung. Das hierbei entwickelte Kohlendioxyd reißt<sup>1)</sup> nämlich einen Teil des Acetons mit sich, auch wenn der Oxalsäurezusatz mit der größten Vorsicht vorgenommen wird. Hier unten erfolgt eine Zusammenstellung der Versuche.

1. 10 ccm Acetonlösung (direkt 9,6 ccm  $n_{10}$ -Jod) + 50 ccm  $n_{10}$ -KMnO<sub>4</sub> + 1 ccm CH<sub>3</sub>COOH wurden 20 Minuten unter Rückfluß gekocht, mit Oxalsäurelösung entfärbt, mit 20 ccm 20% iger Natronlauge gefällt und nach der Filtrierung mit  $n_{10}$ -Jodlösung behandelt. Jodverbrauch: 6,4 ccm  $n_{10}$ -Jod.

2. Wie bei 1, Jodverbrauch: 5,9 ccm  $n_{10}$ -Jod.

3. > > 1, > : 6,6 > >

4.<sup>2)</sup> > > 1, > : 8,7 > >

5.<sup>2)</sup> > > 1, > : 8,0 > >

6.<sup>2)</sup> > > 1, > : 8,2 > >

In sämtlichen Versuchen wurde also ein Acetonverlust konstatiert, und zwar bei tropfenweisem Zusatz von Oxalsäure etwa 15%, bei vorsichtigem, aber schnellerem Zusatz bis zu 30 bis 40%.

<sup>1)</sup> Vergleiche die Folin'sche Methode für die Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure, wo das Aceton durch Durchblasung eines Luftstromes bei gewöhnlicher Temperatur isoliert wird.

<sup>2)</sup> Die Oxalsäurelösung wurde mittels Scheidetrichters äußerst vorsichtig tropfenweise zugesetzt.

Daß das Kohlendioxyd wirklich das Aceton mit sich zu reißen vermag, ist auf folgende Weise festgestellt worden.

Nach abgeschlossenem Kochen wurden in die obere Mündung des Kühlers teils ein Scheidetrichter und teils eine mit Wasser gefüllte Kugelhöhre mittels eines doppeltgebohrten Pfropfens eingepaßt. Die Oxalsäurelösung wurde vom Scheidetrichter tropfenweise hinzugeträufelt und das entwickelte Kohlendioxyd mußte die Kugelhöhre passieren. Nach der Entfärbung des Permanganates wurde das Wasser in der Kugelhöhre untersucht, wobei ich immer einen positiven Ausschlag für Aceton erhielt — in der Regel mit der Liebenschens (deutliche Jodoformfällung) und immer mit der Frommer-Engfeldtschen<sup>1)</sup> Acetonprobe.

Als Resultat des Versuchs mit Aceton und Permanganatessigsäure geht somit hervor, daß das Aceton gar nicht, oder nur in unbedeutendem Grade angegriffen wird, daß dagegen aber bei Anwendung der Lenkschen Methodik ein beträchtlicher Acetonverlust stattfindet.

### Die Einwirkung der Permanganatessigsäure auf die Acetessigsäure.

Bei der kontrollierenden Untersuchung, die ich zur Ermittlung der Einwirkung des Permanganats auf die Acetessigsäure ausgeführt habe, hat sich, wie ich schon im Vorhergehenden angedeutet habe, gezeigt, daß im großen ganzen eine Acetonbildung (Ketonspaltung) nicht zustande kommt, und soweit bin ich mit dem Verfasser vollständig einig. Dagegen fühle ich mich von der Richtigkeit in der Diskussion des Verfassers über den Reaktionsverlauf zwischen Acetessigsäure, Essigsäure und Permanganat nicht überzeugt. Der Verfasser führt an: „Beim Kochen der Lösung der beiden Acetonkörper mit Oxalsäure wird die Acetessigsäure in Aceton übergeführt (Gesamtaceton), beim Kochen mit Essigsäure bleibt das Aceton unberührt, während die

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

Acetessigsäure in das Acetat der  $\beta$ -Oxycrotonsäure übergeht. Das Acetat der  $\beta$ -Oxycrotonsäure gibt nicht mehr die gewöhnlichen Acetessigreaktionen, spaltet sich aber bei Gegenwart von Permanganat höchstwahrscheinlich an der Stelle der Doppelbindung auf.

Tatsächlich erscheint es höchst unwahrscheinlich, daß die Essigsäure in der hier in Frage kommenden Konzentration acetylierend auf die Acetessigsäure wirken sollte, die bei der Reaktion folglich als Alkoholsäure ( $\beta$ -Oxycrotonsäure, Enolform,  $\text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{OH}) : \text{CH} \cdot \text{COOH}$ ) fungieren sollte. Bei der Destillation von Acetessigsäure bei Gegenwart recht bedeutender Mengen Essigsäure hat sich, im Gegensatz zu der Angabe des Verfassers, in Wirklichkeit gezeigt, daß eine vollkommen normale Acetonbildung zustande kommt. Bei Destillationsversuchen mit denselben Quantitäten Acetessigsäure unter Anwendung verschiedener Säuren (Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure, Essigsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure) haben die erhaltenen Destillate dieselben Mengen Jod verbraucht, ja auch in neutraler und sogar in schwach alkalischer Lösung ist dies der Fall gewesen.

Meine oben ausgesprochene Vermutung, daß die Essigsäure bei Gegenwart von Permanganat nicht auf die Weise, wie Verfasser es glaubhaft machen will, an der Reaktion teilnimmt, wird auch dadurch bestätigt, daß sie entweder vollständig ausgeschlossen oder gegen andere Säuren (Schwefel- und Phosphorsäure) vertauscht werden kann, ohne daß das Resultat sichtbar ein anderes wird, d. h. die Acetessigsäure wird unter den zuletzt angeführten Bedingungen ohne nennenswerte Acetonbildung durch das Permanganat zersetzt.

Die Destillationsversuche mit Permanganat wurden unmittelbar nach der Vakuumbehandlung der Acetessigsäurelösung<sup>1)</sup> ausgeführt. Diese Behandlung wurde im übrigen in

<sup>1)</sup> Bei den hier angeführten Versuchen wurde eine hauptsächlich nach den in Neubergs «Der Harn» angegebenen Vorschriften auf folgende Weise dargestellte Acetessigsäure verwendet: 13 ccm Acetessigsäureätyl-ester wurden durch Behandlung mit einer Natronhydratlösung (7 : 500) 24 Stunden lang einer kalten Verseifung unterworfen, worauf  $\text{CO}_2$  zur

allen den Fällen, wo die Acetessigsäurelösung mehr als 24 Stunden vermehrt wurde, wiederholt.

1. 10 ccm Acetessigsäurelösung (welche 10,5 ccm  $n_{10}$ -Jod äquivalent waren) + 50 ccm  $n_{10}$ - $\text{KMnO}_4$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$  wurden unter Hinzuträufelung von Wasser auf das konstante Volumen der Destillation unterworfen. Jodverbrauch der Destillate: 0,55 ccm  $n_{10}$ -Jod.

2. Wie bei 1, Jodverbrauch der Destillate: 0,50 ccm  $n_{10}$ -Jod.

3. > > 1, mit 1 g  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (wasserfrei) Jodverbr.: 0,55 ccm  $n_{10}$ -Jod.

4. > > 1, > 1 >  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( > ) > : 0,55 > >

5. > > 1, ohne Säure > : 0,55 > >

6. 20 ccm (Äquivalent mit 22,8 ccm  $n_{10}$ -Jod) + 100 ccm  $n_{10}$ - $\text{KMnO}_4$  + 2 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$  wurden 20 Minuten unter Wasserzuträufelung auf das konstante Volumen destilliert. Jodverbrauch: 1,4 ccm  $n_{10}$ -Jod.

7. 20 ccm (Äquivalent mit 22,8 ccm  $n_{10}$ -Jod) + 100 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 2 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$  wurden ohne Wasserzuträufelung destilliert. Jodverbrauch: 1,3 ccm  $n_{10}$ -Jod.

8. Wie bei 7, Jodverbrauch: 1,2 ccm  $n_{10}$ -Jod.

9. > > 7, ohne Essigsäure. Jodverbrauch: 1,3 ccm  $n_{10}$ -Jod.

Aus den Versuchen mit Acetessigsäure und Permanganat geht somit hervor, daß die Säure in keinem nennenswerten Grade einer Acetonspaltung unterliegt, ob nun Essigsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure gegenwärtig sind oder nicht. Die Destillate verbrauchen zwar eine geringe, ungefähr 5% der gegenwärtigen Acetessigsäure entsprechende Menge Jod; die durch diese Nebenreaktion verursachte Verminderung der Ausbeute kann aber um so mehr geduldet werden, da sie, wie es scheint, konstant ist. Bei näherer Untersuchung hat sich ergeben, daß die jodverbrauchende Substanz zum größeren Teil aus Aceton besteht. Es ist indessen schwer, wenn nicht unmöglich, mit Bestimmtheit zu sagen, ob dieses sich bei der Permanganatbehandlung selbst durch die Acetessigsäure gebildet

vollen Sättigung eingeleitet wurde. Die Flüssigkeit wurde hierauf zur Entfernung des unverseiften Esters 5 mal mit Äther ausgeschüttelt und dann, zum Zwecke der Entfernung des Äthers und Alkohols und des möglicherweise bei der Behandlung gebildeten Acetons im Vakuum bei etwa 25° C. behandelt. Ein Teil der Lösung wird mit 9 Teilen Wasser verdünnt. In der verdünnten Lösung war der Alkaliüberschuß sehr unbedeutend. Eine Neutralisierung mit Schwefelsäure wurde deshalb und auch aus dem Grunde nicht vorgenommen, weil die freie Acetessigsäure bedeutend unbeständigerer Natur ist, als ihr Alkalisalz.



hat, oder ob es in der Acetessigsäurelösung schon vor Beginn der Versuche als Verunreinigung gegenwärtig gewesen ist. Als Stütze für die letztere Annahme kann man anführen, daß der Jodverbrauch auch bei einer recht bedeutenden Veränderung der Versuchsbedingungen konstant bleibt. Die Vakuumbehandlung der Acetessigsäurelösung ist möglicherweise für die Entfernung einer eventuell in derselben befindlichen Verunreinigung von Aceton nicht vollkommen ausreichend. Dem sei jedoch, wie ihm wolle, das Resultat bei der Destillation der Acetessigsäure mit Permanganat erscheint mir doch in der Tat befriedigend.

Die Frage, wie der Reaktionsverlauf zwischen der Acetessigsäure und dem Permanganat zu erklären ist, lasse ich vorläufig offen. Es ist indessen sehr wahrscheinlich, daß das Permanganat infolge seiner starken Oxydationsfähigkeit bedeutend mehr abbauend auf die Acetessigsäure wirkt, als es bei der gewöhnlichen sog. Säurespaltung der Fall ist.

#### Die Anwendung der Lenkschen Methode auf den Harn.

Schon im Vorhergehenden habe ich Gelegenheit gehabt, zu zeigen, daß nach der Behandlung normalen Harns mit Permanganat und Schwefelsäure ein bedeutender Jodverbrauch stattfindet. Dasselbe ist der Fall, wenn man die Schwefelsäure gegen Essigsäure austauscht. Bei Gegenwart von Traubenzucker im Harn steigt der Jodverbrauch auf das Vielfache. Eine Untersuchung von 5 Proben normalen Harns in voller Übereinstimmung mit den Vorschriften des Verfassers hat als Resultat die Werte von 1,8, 1,1, 1,2, 1,7, 1,8 ccm  $n/10$ -Jod (Mittel 1,5 ccm) auf 10 ccm Harn ergeben. Die diesem Jodverbrauch entsprechende Menge Aceton beträgt ungefähr 150 mg pro Liter, während der wirkliche Acetongehalt 2—3 mg pro Liter nicht wesentlich übersteigt. Führt man diese Versuche nach Zusatz von 2,5% Traubenzucker aus, so steigt der Jodverbrauch auf 8,1, 7,8, 5,8, 7 und 7,4 ccm  $n/10$ -Jod (im Mittel 7,2 ccm) auf 10 ccm Harn, was ungefähr 700 mg Aceton pro Liter entsprechen würde. Vergleicht man diese Werte mit den

unter physiologischen Verhältnissen vorkommenden, so erscheinen sie vollständig ungereimt und bekunden die Untauglichkeit der Lenkschen Methode auf eine überzeugende Weise.

Eine auf die Lenksche Reaktion gegründete Methode für getrennte Bestimmungen von Aceton und Acetessigsäure im Harn.

Wenn auch die Lenksche Methodik für getrennte Bestimmungen von Aceton und Acetessigsäure im Harn, wie ich eben gezeigt habe, nicht als befriedigend betrachtet werden kann, so scheint mir anderseits die von dem genannten Verfasser gemachte Beobachtung über das Verhältnis der Acetessigsäure zum Permanganat sowohl interessant wie wertvoll zu sein und die Möglichkeit einer Verwirklichung der Idee des Verfassers in sich zu tragen. Im Gegensatz zum Verfasser halte ich jedoch das «Destillationsverfahren» für die Erzielung eines befriedigenden Ergebnisses notwendig.

Ein Umstand, dem der Verfasser keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt zu haben scheint, dessen Feststellung aber bedeutungsvoll ist, ist die Einwirkung, welche der wichtigste der drei «Acetonkörper», nämlich die  $\beta$ -Oxybuttersäure, auf das Resultat ausüben könnte. Wie bekannt, ist die letztere Säure immer in Aceton in pathologischer Menge enthaltendem Harn, ja wahrscheinlich auch in normalem Harn, obschon hier nur in unbedeutender Menge, gegenwärtig. Die  $\beta$ -Oxybuttersäure läßt sich durch verschiedene Oxydationsmittel, wie z. B. Chromsäure, Wasserstoffsperoxyd, Ammoniumpersulfat, ja auch Permanganat in stark verdünnter Lösung,<sup>1)</sup> leicht in Aceton oxydieren. Bei der Oxydation bildet sich zwar in erster Reihe Acetessigsäure, wir sind aber nicht berechtigt, a priori anzunehmen, daß nicht bei der Permanganatbehandlung eine partielle Acetonbildung zustande kommen kann. Um festzustellen, wie es sich in der berührten Beziehung verhält, wurde eine Mischung von 10 ccm  $\beta$ -Oxybuttersäure (47 mg, als Ca-Zn-Salz nach

<sup>1)</sup> Engfeldt, Diese Zeitschr., Bd. 99, S. 205.

Schäffer,<sup>1)</sup> 50 ccm  $n/1$ -KMnO<sub>4</sub> und 1 ccm CH<sub>3</sub>COOH 20 Minuten lang der Destillation bei konstantem Volumen (Wasserzutropfung) unterzogen. Hierbei wurde ein Destillat erhalten, das Acetonreaktion nach Lieben nicht gab und bei der Behandlung nach Messinger kein Jod verbrauchte. Wir sehen somit, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure unter den angegebenen Bedingungen nicht durch Permanganat zu Aceton oxydiert wird, und daß somit ihre Gegenwart im Harn bei der Bestimmung des präformierten Acetons nicht störend auf das Resultat wirkt. Diese Tatsache ist von der größten Bedeutung und vermindert die Schwierigkeit, mit Hilfe der Lenkschen Reaktion ein anwendbares Verfahren für die Trennung des Acetons und der Acetessigsäure zu finden, in einem beträchtlichen Grade.

Untersuchen wir schließlich die Eigenschaften der sich bei der Oxydation normalen Harnes und solches mit Traubenzucker versetzten Harnes bildenden Körper, so finden wir, daß die flüchtigen Teile (die Destillate) eine verhältnismäßig schwache Jodoformreaktion geben (Lieber), aber dagegen kräftig reduzierend sind (Alkali-Ammon.-Silber) und vor allem, daß ihre vollständige Entfernung durch Umdestillation mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung in der Tat möglich ist. Eine kolorimetrische Untersuchung der Destillate nach der Frommer-Engfeldtschen<sup>2)</sup> Acetonprobe ergibt, daß bei der Oxydation wahrscheinlich eine Neubildung von Aceton in einem sehr geringen Grade zustande gekommen ist. Dieses Aceton, das seinen Ursprung höchstwahrscheinlich vom Traubenzucker herleitet,<sup>3)</sup> ist jedoch in so unbedeutender Menge vorhanden, daß es bei der Untersuchung pathologischen Harnes ohne weiteres unberücksichtigt bleiben kann.

Bei der Ausarbeitung der Methodik für getrennte Aceton- und Acetessigsäurebestimmungen im Harn habe ich teils eine chemisch reine, mit Permanganat umdestillierte Acetonlösung, teils eine auf die vorher angegebene Weise hergestellte, un-

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

<sup>2)</sup> Engfeldt, Berl. klin. Wochenschr., Nr. 31 (1915).

<sup>3)</sup> Engfeldt, Diese Zeitschr., Bd. 99, S. 191.

mittelbar vor den Versuchen durch Behandlung im Vakuum von Verunreinigung mit Aceton möglichst befreite Acetessigsäurelösung verwendet. Sowohl die Aceton- wie die Acetessigsäurelösung wurde 20 Minuten einer Destillation in essigsaurer Lösung unterworfen, und dann der Jodverbrauch in den Destillaten nach Messinger nach 15 Minuten Einwirkung bestimmt. Hierauf wurde die Acetessigsäurelösung zum Zwecke der Feststellung der Menge Aceton und anderer jodverbrauchender Substanzen, die sich bei dieser Behandlung aus der Acetessigsäure bilden, 20 Minuten einer Destillation mit Permanganat und Essigsäure unterzogen, und schließlich wurde eine Mischung von Aceton und Acetessigsäure der Destillation mit Permanganat und Essigsäure unterzogen und dann der Jodverbrauch im Destillate bestimmt. Als Resultat dieser Vorversuche geht, wie schon im Vorhergehenden betont ist, hervor, daß das Aceton nicht angegriffen wird. Dagegen sind wir gezwungen, mit einem geringeren Verlust von Acetessigsäure zu rechnen, indem etwa 5% derselben mutmaßlich der Acetonspaltung unterliegen, obschon nicht mit Sicherheit zu entscheiden ist, ob das in den Destillaten gefundene Aceton seinen Ursprung direkt von der Acetessigsäure herleitet, oder ob es sich, wie schon vorher erwähnt ist, vor Beginn der Versuche als Verunreinigung in denselben befunden hat.

Wendet man die obenerwähnte Methodik auf mit Traubenzucker, Aceton und Acetessigsäure versetzten Harn an, so erhält man als Resultat Destillate, die beträchtlich mehr Jod verbrauchen, als wie dem bei den Versuchen anwesenden Aceton entspricht. Bei der Untersuchung der erhaltenen Destillate zeigte sich, daß sie Substanzen mit stark reduzierenden Eigenschaften enthalten. Durch Redestillation mit Wasserstoffsperoxyd in alkalischer Lösung werden die reduzierenden jodverbrauchenden Substanzen indessen vollständig entfernt. Das bei den Versuchen angewendete Aceton läßt sich somit auf die angedeutete Weise isolieren und quantitativ in den neuen Destillaten wiederfinden. Die Ausbeute wird relativ befriedigend, obschon infolge der partiellen Acetonspaltung der Acetessigsäure etwas zu hoch.



Die Bestimmung des Gesamtacetons im Harn kann auf die gewöhnliche Weise durch 20 Minuten Destillation in schwach essigsaurer Lösung ausgeführt werden. Wendet man bei diesen Versuchen 10—20 ccm Harn an und verdünnt diesen vor der Destillation mit 300—400 ccm Wasser und gebraucht nicht mehr als  $\frac{1}{2}$ —1 ccm Essigsäure, so werden die Phenolverbindungen des Harns nicht hydrolysiert und folglich nicht in flüchtige Form übergeführt. Wir brauchen unter solchen Umständen nicht mit der Fehlerquelle zu rechnen, die die Gegenwart dieser Körper in sich trägt, und die sich bei der Titrierung durch vermehrten Jodverbrauch zu erkennen gibt. Von der minimalen Menge anderer flüchtiger jodverbrauchender Substanzen, die nebst dem Aceton überdestillieren, kann man ruhig absehen. Als Aceton berechnet, machen sie nämlich nicht mehr als 1—2 mg pro Liter aus. Der Unterschied zwischen der totalen und der präformierten Acetonmenge kann als Acetessigsäure umgerechnet werden. Hierbei muß man annehmen, daß die Resultate von etwa 5% hinter den wirklichen zurückbleiben.

1. 10 ccm Aceton, 20 Minuten in essigsaurer Lösung destilliert. Jodverbrauch: 9,6 ccm  $n_{10}$ -Jod.

2. 10 ccm Acetessigsäure, 20 Minuten in essigsaurer Lösung destilliert. Jodverbrauch: 9,8 ccm  $n_{10}$ -Jod.

3. 10 ccm Acetessigsäure + 50 ccm  $n_{10}$ - $\text{KMnO}_4$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 20 Minuten bei konstantem Volumen (Wasserezuträufelung) destilliert. Jodverbrauch: 0,5 ccm  $n_{10}$ -Jod.

4. 10 ccm Aceton + 10 ccm Acetessigsäure + 100 ccm  $n_{10}$ - $\text{KMnO}_4$  + 2 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 20 Minuten bei konstantem Volumen destilliert. Jodverbrauch: 10,2 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 106,2%, Acetessigsäure 93,8%.

5. 10 ccm Aceton + 10 ccm Acetessigsäure + 100 ccm 5% ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ohne Wasserezuträufelung 20 Minuten destilliert. Jodverbrauch: 10,1 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 105,2%, Acetessigsäure 94,8%.

6. Wie bei 5, Jodverbrauch: 10,2 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 106,2%, Acetessigsäure 93,8%.

7. 10 ccm Aceton + 10 ccm Acetessigsäure + 10 ccm Harn + 1 g Traubenzucker + 100 ccm 5% ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$  20 Minuten destilliert. Jodverbrauch: 15,6 ccm.

Nach Umdestillieren mit  $\text{NaOH}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Jodverbrauch: 10 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 104,2%, Acetessigsäure 95,8%.

8. Wie bei 7, Jodverbrauch: 10,1 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 105,2%, Acetessigsäure 94,8%.

9. 10 ccm Aceton, 20 Minuten in essigsaurer Lösung destilliert. Jodverbrauch: 9,9 ccm  $n_{10}$ -Jod.

10. 10 ccm Acetessigsäure, 20 Minuten in essigsaurer Lösung destilliert. Jodverbrauch: 11 ccm  $n_{10}$ -Jod.

11. 10 ccm Acetessigsäure + 100 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 20 Minuten ohne Wasserzuträufelung destilliert. Jodverbrauch: 0,7 ccm  $n_{10}$ -Jod.

12. 10 ccm Aceton + 10 ccm Acetessigsäure + 100 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 20 Minuten destilliert. Jodverbrauch: 10,7 ccm.

13. 10 ccm Aceton + 10 ccm Acetessigsäure + 10 ccm Harn + 1 g Traubenzucker + 100 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  + 100 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 1 ccm  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 20 Minuten destilliert und mit  $\text{NaOH}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  umdestilliert. Jodverbrauch: 10,4 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 105%, Acetessigsäure 95%.

14. Wie bei 13, Jodverbrauch: 10,5 ccm  $n_{10}$ -Jod. Aceton 106%, Acetessigsäure 94%.

### Untersuchung pathologischen Harns.

Als Material für diese Untersuchung habe ich einen diabetischen, acetonhaltigen, vom Serafimerlazarett in Stockholm erhaltenen Harn<sup>1)</sup> angewendet. Der ganz frische, noch körperwarme Harn wurde unmittelbar an Ort und Stelle der Destillation mit Permanganat in essigsaurer Lösung zum Zwecke der Isolierung des präformierten Acetons unterzogen. Hierauf wurde die Untersuchung am physiol.-chem. Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Ende geführt, wobei sowohl der Zuckergehalt wie die Menge Gesamtaceton der Gegenstand von Bestimmungen wurde. Nachdem der Harn 7 Tage lang (in einem Falle 1 Tag) ohne irgend welches Konservierungsmittel bei Zimmertemperatur verwahrt worden war, wurde er zur Feststellung des Verhältnisses zwischen dem präformierten und dem Gesamtaceton nach einer Verwahrung während der ebengenannten Zeit einer erneuerten Untersuchung unterzogen. Die auf nebenstehender Tabelle zusammengeführten Resultate sind in mehreren Beziehungen beachtenswert.

<sup>1)</sup> Herrn Professor Israel Holmgren, der das klinische Material bereitwilligst zu meiner Verfügung gestellt hat, spreche ich hiermit meinen Dank aus.

Der allergrößte Teil des Gesamtacetons scheint in frischem Harn als Acetessigsäure vorhanden zu sein, ein Verhältnis, das indessen schon früher auf anderen Wegen von Embden und Schliep<sup>1)</sup> (durch Vakuumdestillation) und von Folin<sup>2)</sup> (durch Treiben eines Luftstromes durch den Harn) festgestellt worden ist.

Die von mir erhaltenen Werte für die Acetessigsäure wechseln zwischen 81,1 und 90% des Gesamtacetongehaltes. Diese Werte sind jedoch, aus den vorher erwähnten Gründen, als Mindestwerte zu betrachten, da ein wahrscheinlicher Verlust von 5% im Analysenresultat mit in Rechnung zu ziehen ist. Im Zusammenhange hiermit sind die Werte für das präformierte Aceton als Höchstwerte zu betrachten, weil die ebenerwähnten 5% darin einbegriffen sind.

Was mir aber bei dieser Untersuchung von größtem Interesse zu sein scheint, das ist die große Haltbarkeit der Acetessigsäure, die auch bei sehr unachtsamer Aufbewahrung zu bemerken war. Das Untersuchungsergebnis zwingt uns nämlich, die gewöhnliche Auffassung über die diesbezüglichen Eigenschaften der Acetessigsäure in einem nicht unbedeutenden Grade zu modifizieren.

Nach einer eintägigen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur finden wir (Probe Nr. 8), daß die Acetessigsäure nur in einem sehr geringen Grade eine Zersetzung erfahren hat, indem der Gehalt nur einige Prozent, oder von 81,1 auf 78% gesunken ist. Nach 7tägiger Aufbewahrung ohne Konservierungsmittel befand sich der Harn in heftiger Gärung mit kräftiger Schimmelbildung. Der Acetessigsäuregehalt war jedoch nicht niedriger als bis auf ungefähr 60% gesunken<sup>3)</sup>. Bei Versuchen mit der Gerhardtschen Eisenchloridreaktion

<sup>1)</sup> Embden und Schliep, Centralblatt f. d. ges. physiol. u. patholog. Stoffw. (N. F.), Bd. 2, S. 250 u. 289 (1907).

<sup>2)</sup> Folin, Journ. of biol. Chem., Bd. 3, S. 177 (1902).

<sup>3)</sup> Ein Verhältnis, das ebenfalls verdient, hervorgehoben zu werden, ist, daß eine Zunahme der Gesamtacetonmenge nicht stattgefunden hat. Eine Acetonbildung aus der im Harn befindlichen  $\beta$ -Oxybuttersäure scheint also während der Aufbewahrung nicht zustande zu kommen.

Tabelle I.

Nr.	Probe von	Probe entnommen	Harn				Verhältnis der präform. Acetonmenge zum Gesamt-aceton %	Verhältnis des Acetessigsäureacetons zum Gesamt-aceton %	Anm.
			c. v. Zucker	Zeit der Untersuchung	Präformiertes Aceton mg %	Gesamt-aceton mg %			
1	Mann, 31 Jahre	29./3. 12 <sup>30</sup> nachm.	1,036	unmittelbar	6,77	51,25	13,2	86,8	Harn ohne
2	„ 31 „	29./3. 12 <sup>30</sup> „	—	n. 7 Tagen	18,37	50,28	36,5	63,5	Kon-
3	„ 31 „	29./3. 3 <sup>10</sup> „	1,036	unmittelbar	9,67	96,70	10	90	servierungs-
4	„ 31 „	29./3. 3 <sup>10</sup> „	—	n. 7 Tagen	26,11	97,67	26,7	73,3	mittel bei
5	„ 25 „	29./3. 12 <sup>55</sup> „	1,030	unmittelbar	43,51	237,88	18,3	81,7	Zimmerlem-
6	„ 25 „	29./3. 12 <sup>55</sup> „	—	n. 7 Tagen	100,57	238,85	42,1	57,9	peratur ver-
7	„ 25 „	29./3. 3 <sup>40</sup> „	1,031	unmittelbar	35,78	189,53	18,9	81,1	wahrt, in
8	„ 25 „	29./3. 3 <sup>40</sup> „	—	n. 24 Std.	41,58	188,56	22	78	heftiger Gä-
9	„ 25 „	29./3. 3 <sup>40</sup> „	—	n. 7 Tagen	81,23	186,63	43,5	56,5	rung, kräftige

Schimmelbildung, nach 7 Tagen noch positiv für Gerhardt



erhielt ich einen deutlichen positiven Ausschlag. Das letztere Verhältnis ist bemerkenswert, da im allgemeinen die Ansicht herrscht, daß die Acetessigsäure beim Stehen sehr schnell zerfällt, und daß man deshalb die Gerhardtsche Reaktion, um nicht irre geführt zu werden, in möglichst frischem Harn ausführen muß.

Schon 1882 hat Ceresole<sup>1)</sup> als der erste die freie Acetessigsäure isoliert und ihre Eigenschaften festgestellt. Die schon damals von ihm gemachte Beobachtung, daß die Alkali- und Baryumsalze der Säure in verdünnter Lösung bei gewöhnlicher Temperatur sehr haltbar seien, scheint nicht die nötige Aufmerksamkeit erweckt zu haben, wenigstens findet man in unseren Lehr- und Handbüchern der physiologischen Chemie oder größeren klinischen Sammelwerken<sup>2)</sup> seltener einen Hinweis in dieser Beziehung. Daß die acetessigsäuren Salze des Harns indessen bedeutend haltbarer sind, als man im allgemeinen anzunehmen geneigt ist, dürfte aus den von mir ausgeführten Untersuchungen hervorgehen. Im Zusammenhange hiermit dürfte festzustellen sein, daß die Gerhardtsche Acetessigsäurereaktion in dem Werte, den sie haben kann, auch bei der Untersuchung von eine recht beträchtliche Zeit aufbewahrtem Harn anwendbar ist.

### Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht als Resultat hervor:

1. daß die Lenksche Methode für getrennte Bestimmungen von Aceton und Acetessigsäure unanwendbare Werte liefert;
2. daß dagegen das von Lenk gefundene Reaktionsverhältnis zwischen Acetessigsäure und Permanganat einer befriedigenden Methodik für die Bestimmung dieser Körper zugrunde gelegt werden kann.

---

<sup>1)</sup> Ceresole, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 15, S. 1326 u. 1871 (1882).

<sup>2)</sup> Eine Ausnahme hiervon macht Neuberg, «Der Harn», wo Ceresoles Beobachtungen in der genannten Beziehung aufgenommen sind.

Die Bestimmungen werden nach folgenden Detailvorschriften ausgeführt.

#### Die Bestimmung des präformierten Acetons.

100 ccm 5%iges Kaliumpermanganat werden mit 100 ccm Wasser gemengt und mit 1 ccm konzentrierter Essigsäure angesäuert. Hierauf werden 10 ccm Harn zugesetzt und die Mischung wird dann 20 Minuten der Destillation unterzogen. Als Vorlage wird ein an das Kühlrohr luftdicht schließender, mit 100 ccm kaltem Wasser versehener und durch eine mit Wasser gefüllte Peligotsche Röhre von der äußeren Luft abgesperrter Kolben angewendet. Das Destillat wie der Inhalt dieser Röhre werden mit Wasser auf etwa 300 ccm verdünnt, mit 20 ccm 25%iger Natronlauge und 10 ccm 3%igem Perhydrol <sup>1)</sup> versetzt und einer erneuerten Destillation unterworfen. Hierbei wird die Flüssigkeit erst sehr vorsichtig auf etwa 80° erhitzt und 15—30 Minuten bei dieser Temperatur gehalten, wonach die Destillation in 20 Minuten zu Ende geführt wird.

Der Jodverbrauch wird im Destillat nach Messinger bestimmt, wobei zu beachten ist, daß das Jod 15 Minuten einwirken muß. 1 ccm  $n_{10}$ -Jod = 0,967 mg Aceton.

#### Die Bestimmung des Gesamtacetons.

10 ccm Harn wurden mit 300 ccm Wasser gemengt, mit 0,5 ccm konzentrierter Essigsäure angesäuert und zur Vermeidung eines Acetonverlustes unter eben angegebenen Vorsichtsmaßregeln 20 Minuten der Destillation unterzogen. Der Jodverbrauch wird im Destillat nach Messinger bestimmt. 1 ccm  $n_{10}$ -Jod = 0,967 mg Aceton. Der Unterschied zwischen dem Gesamtaceton und dem präformierten Aceton gibt den Gehalt des Harns an Acetessigsäureaceton an. Die Ausbeute des letzteren ist als ungefähr 5% unter der wirklichen betragend zu betrachten.

3. daß in frischem, acetonhaltigem Harn die Acetessigsäure (als Aceton berechnet) 80—90% des Gesamtacetons beträgt, Verhältnisse, die mit den nach anderen Methoden gefundenen gut übereinstimmen;

4. daß die im Harn befindliche Acetessigsäure bei der Aufbewahrung eine bedeutend größere Stabilität besitzt, als man im allgemeinen annimmt, und daß die Gerhardsche Eisenchloridreaktion infolgedessen auch bei der Untersuchung von mehreren Tagen lang aufbewahrtem Harn anwendbar ist.

---

<sup>1)</sup> Durch Verdünnung von Mercks 30% erhalten. Das im Handel gewöhnlich vorkommende 3%ige Wasserstoffsperoxyd, das gewisse Konservierungsmittel enthält, ist im allgemeinen nicht anwendbar.