

Quantitative Bestimmung der Glukuronsäure im Urin mit der Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode.

Von

Dr. C. Tollens, Oberarzt der Anstalt.

Mit einer Tafel.

(Aus der städtischen Krankenanstalt in Kiel, Prof. Dr. Hoppe-Seyler.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juni 1909.)

Die bisherigen Methoden zur quantitativen Bestimmung der gepaarten Glukuronsäuren des Urins versuchen fast alle, die Glukuronsäuren durch Bleifällung auszufällen, so möglichst zu isolieren und dann durch Spaltung des Bleiniederschlages die freie Glukuronsäure von konstantem optischen Drehungsvermögen zu erlangen. Aber bei der großen Labilität der Glukuronsäuren sind diese Methoden durchaus nicht zuverlässig und haben keine allgemeine Anwendung zur quantitativen Glukuronsäurebestimmung finden können. Überhaupt ist es von vornherein eine recht mißliche Sache, im Urin mit seinen verschiedensten, optisch aktiven Stoffen eine in verhältnismäßig kleiner Menge vorhandene Substanz, wie die Glukuronsäure, polarimetrisch zu bestimmen. Man kommt immer nur zu Schätzwerten, zu Wahrscheinlichkeitsbestimmungen. Auch mit der Isolierung der Glukuronsäure als p.-Bromphenylhydrazinverbindung, die an sich sehr gut zur qualitativen Bestimmung der im Urin vorhandenen gepaarten Glukuronsäure dienen kann, kommt man nicht zu einer annehmbaren quantitativen Bestimmung der Gesamtglukuronsäure, vielmehr ist man immer wieder auf Schätzung, auf Berechnung von Minimalwerten angewiesen.

Ein genaues, auch für das klinische Laboratorium passendes Verfahren der quantitativen Glukuronsäurebestimmung im Urin

gab es also nicht. Es lag aber der Gedanke nahe, zur quantitativen Bestimmung der gepaarten Glukuronsäuren des Urins die Methode von B. Tollens und seinen Schülern¹⁾ anzuwenden, welche, ursprünglich zur Bestimmung der Pentosane und Pentosen in pflanzlichen und tierischen Stoffen ausgearbeitet, auch für Glukuronsäure empfohlen worden ist.

Das Prinzip der mit genauen Vorschriften versehenen Methode ist, die Glukuronsäure zur quantitativen Bestimmung zunächst durch Destillation mit Salzsäure in Furfurol und Kohlensäure zu zerspalten: $C_6H_8O_6 = C_5H_4O_2 + CO_2 + H_2O$, Glukuronsäurelacton = Furfurol + $CO_2 + H_2O$; diese Spaltung haben de Chalmot,²⁾ Mann³⁾ und B. Tollens zuerst ausgeführt. Das abdestillierte Furfurol wird dann mit Phloroglucin (früher wurde Phenylhydrazin angewandt) aus der Salzsäure enthaltenden Lösung ausgefällt. Der Niederschlag, das Furfurolphloroglucid, wird nach dem Abfiltrieren und Trocknen gewogen. Das Gewicht des Furfurolphloroglucids ist, wie Lefèvre und Tollens⁴⁾ neuerdings fanden, genau $\frac{1}{3}$ der vorhandenen gewesenen Glukuronsäure.

Weiter ist von Lefèvre und Tollens⁴⁾ durch zahlreiche Versuche an gepaarten Glukuronsäuren und sonstigen Derivaten der Glukuronsäure nachgewiesen, daß die Furfurolbildung aus ihnen genau analog der aus freier Glukuronsäure verläuft, daß also die erhaltene Menge von Furfurolphloroglucid der in den gepaarten Glukuronsäuren vorhandenen Menge an Glukuronsäure entspricht.

Bereits von Tollens und de Chalmot⁵⁾ ist nachgewiesen, daß der normale Urin bei der Salzsäuredestillation Spuren von

¹⁾ Siehe besonders die Abhandlung von Dr. E. Kröber, Journal für Landwirtsch., Jg. 1900, S. 355 u. ff. — Siehe auch diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 388 (1905).

²⁾ de Chalmot u. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXV, S. 2569 (1892).

³⁾ Mann u. Tollens, Ann. Chem., Bd. CCXC, S. 157 (1896).

⁴⁾ Lefèvre und Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XL, S. 4513 (1907).

⁵⁾ de Chalmot und Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXV, S. 2571 (1892).

Furfurol liefert. De Chalmot und Tollens operierten mit 200 ccm normalen Menschenharns, den sie abdampften und mit Salzsäure destillierten, wobei sie Furfurolreaktion erhielten; das damals zur Furfurolfällung angewandte Phenylhydrazin gab jedoch keinen Niederschlag. Tollens und de Chalmot schließen nun: «200 ccm dieses Harns enthalten folglich, wenn überhaupt, weniger als 0,04—0,05 g Glukuronsäure (oder auch Pentosen). Weitere Versuche mit verschiedenen, auch pathologischen Harnen müssen erfolgen.» Tollens und de Chalmot fanden also eine recht geringe Menge gepaarter Glukuronsäure oder doch furfurolgebender Substanzen im Urin.

Bei meinen Versuchen mit der B. Tollensschen Methode fand ich nun zuerst bei Anwendung reinen Glukuronsäurelactons ganz ähnliche Resultate wie Lefèvre und Tollens, indem die erhaltenen Mengen Phloroglucids recht genau $\frac{1}{3}$ des angewandten Glukuronsäurelactons betragen. Ebenso erhielt ich bei der Salzsäuredestillation des menschlichen Urins nach dieser Methode regelmäßig Furfurolreaktion und eine zwar geringe, aber in ihrer Menge ziemlich konstante Quantität Phloroglucid. 100 ccm Urin ergaben höchstens 0,008 g Phloroglucid bei verschiedenen gesunden Personen, die dann also höchstens 0,024 g Glukuronsäure in 100 ccm gehabt hätten.

Diese geringe Menge entsprach aber erstens nicht dem Ausfall der Naphthoresorcin-Salzsäurereaktion auf Glukuronsäure,¹⁾ deren Ausgestaltung zu einer leidlich genauen, kolorimetrischen, quantitativen Bestimmungsmethode der Glukuronsäure des Urins mir mittlerweile gelungen war (s. u.). Zweitens bekam ich nach Zusatz einer abgewogenen Menge reinen Glukuronsäurelactons zum Urin nur etwa 30% der nach Lefèvre und Tollens zu erwartenden Phloroglucidmenge; d. h. nicht $\frac{1}{3}$ des zugesetzten Glukuronsäurelactons, sondern nur $\frac{1}{9}$ oder $\frac{1}{10}$, und auch das recht inkonstant.

Es schien mir also im Urin eine Substanz zu sein, deren Gegenwart störend auf den Verlauf der Spaltung wirkte, oder

¹⁾ C. Tollens, Diese Zeitschrift, Bd. LVI, H. 1 (1908); siehe auch B. Tollens, Zeitschr. d. Ver. d. D. Zuckerindustrie, Bd. LVIII, S. 629; Ber. d. D. chem. Ges., Bd. XLI, S. 1788 (1908).

welche vermutlich eine schnelle Verharzung des Furfurols gleich am Orte der Entstehung bewirkte, sodaß nicht die gleiche Menge Furfurol ins Destillat überging, wie sonst bei Benutzung dieser Methode unter Beobachtung der konventionellen Vorschriften.

Die von Schiff¹⁾ angegebene Reaktion auf Harnstoff — Rotfärbung einer Harnstofflösung beim Versetzen mit Furfurolwasser und Salzsäure — ließ mich im Harnstoff den störenden Körper vermuten. Folgender mir von B. Tollens mitgeteilter Glukuronsäure-Salzsäuredestillationsversuch bestärkte mich in dieser Annahme:

A.

Glukuronsäure allein.

0,3212 g Glukuronsäurelacton
gaben mit Salzsäure destilliert:
0,1107 g Furfurolphloroglucid
 $= 3 \times 1107 = 0,3321 = 103,4\%$.

B.

Glukuronsäure + Harnstoff.

0,3 g Glukuronsäurelacton +
2,5 g Harnstoff gaben mit Salz-
säure destilliert:
0,0334 g Furfurolphloroglucid
 $= 3 \times 0,0334 = 0,1002 = 33,4\%$.

Ich versuchte nun, um weiterzukommen, die Glukuronsäure möglichst von den sonstigen im Urin enthaltenen Stoffen zu trennen und auf ein kleines Volumen zu konzentrieren, indem ich sie durch Bleiessig fällte, den Niederschlag abfiltrierte und auswusch. Dies konnte geschehen, weil die Glukuronsäure, sei sie gepaart, sei sie frei vorhanden, vom Bleiessig mit etwas Ammoniak zusammen mit großer Vollständigkeit aus ihren Lösungen ausgefällt wird.

Der Erfolg war ein guter.

Nicht nur fand ich die Menge des Furfurolphloroglucids im normalen Urine bedeutend, um das 2—3fache, erhöht gegenüber meinen früheren Versuchen, sondern vor allem bekam ich auch beim Zusatz freien Glukuronsäurelactons eine Furfurolphloroglucidmenge, die wiederum auf Glukuronsäurelacton umgerechnet 94—98% des zugesetzten entsprach.

Dieser letzte Befund von fast 98% genügt aber den Anforderungen, welche man an eine solche Methode zu stellen gewohnt ist.

¹⁾ Schiff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. X, S. 773 (1877).

Zunächst wäre nun die Frage nach der Herkunft des Furfurols sowohl im Salzsäure-Destillat des normalen, als auch des pathologischen Urins zu beantworten.

Entstammt es den gepaarten Glukuronsäuren des Urins, und gibt es außerdem noch andere Quellen dafür?

Die normalen Urine, mit denen ich bisher arbeitete, waren nach klinischen Untersuchungsmethoden frei von Eiweiß und Zucker. Sie reduzierten also nicht Trommersche und Nylandersche Lösung. Ferner gaben sie nicht deutlich die Orcin-Eisenchloridreaktion auf Pentosen, die allerdings auch von gepaarten Glukuronsäuren gegeben wird. In der Nahrung bekamen die Personen, denen der untersuchte Urin entstammte, keine Pentosen (Früchte, Rüben und dergl.), um auch eine etwaige artifizielle Pentosurie zu vermeiden. Die Naphthoresorcinsalzsäurereaktion auf Glukuronsäure fiel schwach positiv aus, aber die Farbe der Ätherschicht war stark beeinflusst durch Eigenfarbstoffe des Urins und der Absorptionsstreifen im Spektralapparat etwas verwaschen.

Die Spuren von Eiweißstoffen im Urin, die der Untersuchung vielleicht entgangen sein könnten, kommen als Furfurolquellen nicht in Betracht, da Eiweiß überhaupt nur Spuren Furfurol liefert.¹⁾ Zuckerarten, wie Dextrose, liefern ebenfalls nur geringe Furfurolmengen, höchstens 1 0/c.²⁾ Die Spuren physiologischen Harnzuckers sind also auch nicht in Rechnung zu ziehen, sind ja außerdem nicht mit im Bleiniederschlag enthalten. Pentosen kommen nach obigem wohl auch kaum in Betracht.

Ob noch andere Stoffe, die, wie Neuberg und Mandel³⁾ angegeben haben, mit Naphthoresorcine und Salzsäure Reaktionen ähnlich wie Glukuronsäure, aber doch nach meinen Untersuchungen⁴⁾ wohl davon unterscheidbar, geben, als Furfurol-

¹⁾ Günther, de Chalmot und Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXV, S. 257 (1892).

²⁾ Siehe u. a. Tollens, Annal. d. Chem., Bd. CCLXXXVI, S. 301 (1895).

³⁾ Mandel und Neuberg, Biochem. Zeitschr., Bd. XIII, S. 1 u. 2.

⁴⁾ C. Tollens, Münch. med. Wochenschr., 1909, S. 13.

lieferanten in Betracht kommen, ist einstweilen nicht mit Bestimmtheit anzugeben.

Allem Anschein nach ist die Bildung von Furfurol bei der Salzsäuredestillation von Bleiessigniederschlägen aus dem Harn gesunder Personen nach obigem vorzugsweise, wenn nicht ausschließlich auf die gepaarten Glukuronsäuren zu beziehen. Will man ganz vorsichtig sein, so mag man für die furfurolgebenden Substanzen des Harnes den Sammelnamen Furoide einführen, wie dies von Cross und Bevan¹⁾ für die furfurolgebenden Substanzen des Pflanzenreiches geschehen ist, und deren Menge dann durch die erhaltene Menge Furfurolphloroglucids festlegen. Nötig erscheint dies aber für den Urin nicht, ebenso wie die Einführung des Begriffes der Furoide für die Fufurol-liefernden Substanzen der Pflanzen — deren Hauptvertreter bei weitem die Pentosane bilden — nach der Ansicht vieler Chemiker durchaus nicht erforderlich war. Meiner Überzeugung nach geht man nicht fehl, wenn man als Hauptquelle des Furfurols im Bleiniederschlag des Urins die Glukuronsäure ansieht.

Vollkommen eindeutig erscheinen mir die Verhältnisse bei der Feststellung der künstlichen Vermehrung der Ausscheidung gepaarter Glukuronsäuren im menschlichen Urin durch entsprechende Medikamente.

Ich stellte hier zunächst den, wie unten gezeigt werden wird, recht konstanten Tageswert des Furfurolphloroglucids im Urin eines gesunden Menschen fest als Durchschnittswert mehrerer Tage. Dann bekam derselbe bei sonst bezüglich Nahrung, Körperbewegung und sonstigen Bedingungen völlig gleichen Verhältnissen ein glukuronsäurebildendes Medikament (Terpinhydrat z. B. $C_{10}H_{22}O_3$.) Es fand sich jetzt eine meßbare Vermehrung der früher gefundenen Phloroglucidmenge. Die Differenz zwischen dem jetzigen erhöhten Werte und dem früher festgestellten Normalwerte habe ich unbedenklich auf Glukuronsäure beziehen zu dürfen geglaubt.

Zum Beispiel:

Mittlerer, normaler Phloroglucidwert im Urin 0,2 g.

¹⁾ Cross und Bevan, Chemical News, Bd. LXXIII, S. 228; Bd. LXXIV, S. 177.

Nach 5 tägiger täglicher Darreichung von 4 g Terpinhydrat: mittlerer Tageswert 0,4 g.

Die Differenz von 0,2 g würde einer Mehrausscheidung von täglich 0,6 g Glukuronsäure entsprechen.

Bekräftigt wird diese Annahme noch durch die dazu gut stimmenden Ergebnisse der kolorimetrischen Schätzung der Glukuronsäuremengen des Urins, welche die Naphthoresorcinsalzsäurereaktion erlaubt, sobald der Urin ziemlich viel gepaarte Glukuronsäuren enthält. Des genaueren werde ich unten auf diese kolorimetrische Methode zurückkommen.

Methode der quantitativen Bestimmung der gepaarten Glukuronsäure des Urins mittels Bleiessigammoniakfällung und Furfuroldestillation.

Nötige Apparate und Reagenzien.

1. Eine ziemlich große Nutsche mit Saugflasche und gehärtetem Filtrierpapier.

2. Ein Destillierapparat, der sich in seiner Form unmittelbar an den von B. Tollens angegebenen anschließt (cf. Fig.):

a) 1 Literkolben aus Jenaer Glas. Es empfiehlt sich nicht, kleinere Kolben zu benutzen wegen der Gefahr des Überschäumens.

b) Metallbad mit Roseschem Metall.

c) Hahntrichter, der zweckmäßig 75 ccm faßt und bei 30 und 60 ccm mit Marke versehen ist.

d) Schaumfänger.

e) Schlangenkühler (der kleinen Dimensionen wegen von mir als solcher gewählt).

f) Graduirter, 100 ccm fassender Zylinder.

g) Gefäß zum Auffangen des Destillates mit Marke bei 400 und 500 ccm.

3. Porzellangoochtiiegel mit Wägegläschen und passender Saugflasche.

4. Bleiessig.

5. Ammoniak.

6. Salzsäure vom sp. Gew. 1060.

7. Phloroglucinum purrissim. (Merck).

8. Als Reagens auf Furfurol eine frische Lösung von gleichen Teilen Wasser und Anilin, der solange konzentr. Essigsäure zugetropft ist, bis die (plötzlich eintretende) Klärung erfolgt ist.

9. Lang- und feinfaseriger Asbest.

Zur Herrichtung des Filters im Goochtiiegel wird der Asbest zunächst in 2—3 mm lange Stückchen zerschnitten und dann in verdünnter Salzsäure ausgekocht. Hierauf wird solange mit destilliertem Wasser gespült, bis die saure Reaktion verschwunden ist. Der so behandelte Asbest wird in nicht zu dünner Schicht in den Goochtiiegel getan und zusammen mit dem Tiegel ausgeglüht.

250 ccm Urin werden mit 150 ccm Bleiessig und 5 ccm Ammoniak versetzt. Mehrstündiges Absitzenlassen. Mit Hilfe der mit doppeltem gehärteten Filter versehenen Nutsche wird zunächst die klare, überstehende Flüssigkeit entfernt; dann wird der Niederschlag aufs Filter gebracht und mit der Saugpumpe allmählich stärker abgesogen. Von Wichtigkeit ist es, nunmehr den Niederschlag gründlich mit destilliertem Wasser auszuwaschen. Ich benutze dazu regelmäßig 750 ccm Wasser. Man saugt das jedesmal aufgegosene Quantum Wasser, mit dem man vorher noch das Becherglas, welches den Niederschlag enthielt, ausspülte, soweit ab, bis der Niederschlag anfängt, Risse zu bekommen, nicht weiter. Saugt man nämlich noch weiter, so bilden sich tiefe, lange Risse im Niederschlage, durch die die nächsten Portionen Waschwasser schnell und häufig leicht getrübt abfließen, ohne ihren Spülzweck erfüllt zu haben. Nur das letzte Waschwasser saugt man gründlich ab. Hierauf läßt man an einem warmen Orte, z. B. in der Nähe der Heizung, den Niederschlag solange trocknen, bis er rissig geworden und vom Rande losgesprungen ist. Er läßt sich nun leicht mitsamt dem obersten der beiden Filtrierpapiere abheben, zusammenrollen und in den 1 Literkolben des Destillationsapparates befördern. Das zweite Papier benutzt man zum sauberen Auswischen der Nutsche, um es dann ebenfalls in den Kolben zu werfen.

In den Kolben gießt man nun 100 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1060 und beginnt energisch zu destillieren. Jedesmal, wenn 30 ccm in die Vorlage übergegangen sind, läßt man von neuem 30 ccm Salzsäure von 1060 durch den Hahntrichter zulaufen. Man destilliert möglichst schnell und solange, bis die Furfurolprobe nicht mehr positiv ausfällt.

Die Furfurolprobe wird so angestellt, daß man einen Tropfen des aus dem Kühler fließenden Destillates auf einen Streifen Filtrierpapier fallen läßt. Daneben bringt man einen Tropfen des Reagens (8), sodaß die Ränder der Tropfen ineinander überfließen. Beim Vorhandensein von Furfurol bildet sich hier ein roter Teilring.

Man muß im allgemeinen 400—500 ccm übergehen lassen, bis die Reaktion negativ wird. Mit meinem Destillationsapparat gebrauche ich 50—60 Minuten dazu. Die Destillation verläuft, von anfänglichem, durch Regulieren der Flamme leicht zu beherrschendem Schäumen abgesehen, schnell und sicher.

Nach Beendigung der Destillation bereitet man sich eine Lösung von Phloroglucinum purissimum in erwärmter Salzsäurelösung von 1060. Man nimmt etwa doppelt soviel Phloroglucin, als man Furfurolphloroglucid erwartet. Mit 0,25 g wird man wohl immer auskommen.

Die Phloroglucinlösung fügt man unter kräftigem Umschütteln dem Destillat zu und füllt, falls noch weniger als 400 ccm vorhanden, genau auf 400 resp. 500 auf. Zuerst tritt Braunfärbung, dann dichte schwärzliche Trübung auf.

Nach mindestens 16 stündigem Stehen geht man zur Feststellung der Furfurolphloroglucidmenge über.¹⁾ Man filtriert und wäscht aus im mit Asbest beschickten Goochtiegel. Der Porzellantiegel mit der nicht zu dünnen Asbestschicht wird vorher sehr gründlich im Gasmuffelofen ausgeglüht, baldmöglichst in das im Trockenschranke bei 98° getrocknete Wägegläschen gestellt und mit diesem zusammen nach dem völligen Abkühlen gewogen. Ein einmal mit Asbest beschickter Tiegel reicht für 5—6 Be-

¹⁾ Ich habe mich hierbei genau an das von E. Kröber (Journal f. Landwirtsch., Jg. 1900, S. 355 u. ff.) sorgfältigst ausgearbeitete Verfahren gehalten.

stimmungen aus; dann muß das Asbestfilter erneuert werden, weil es etwas verfilzt und dann leicht ein trübes Filtrat liefert.

Das Filtrieren und Auswaschen geschieht mit Hilfe einer schwachwirkenden Saugpumpe und dauert etwa 10—15 Minuten. Zum Auswaschen muß stets dieselbe Menge destilliertes Wasser genommen werden — genau 150 ccm —. Man läßt beim Absaugen des Waschwassers aus dem Tiegel nur soviel abfließen, daß der Niederschlag eine gut feuchte Oberfläche behält: dann fügt man neues Waschwasser hinzu und verfährt ebenso. Man vermeidet es auf diese Weise, daß sich im zu trockenen Niederschlage Risse bilden, durch welche das Waschwasser trübe abläuft, kleine Teilchen des Niederschlages mechanisch mit sich reißend.

Dieses Auswaschen hat sehr sorgfältig zu geschehen, da aus dem Niederschlage alle Salzsäure entfernt werden muß, weil Reste von ihr beim Trocknen einen sehr merklichen Einfluß auf das Gewicht ausüben.

Der Goochtiegel kommt nach dem Auswaschen sofort in das bereits im auf konstante Temperatur von 98—100° gebrachten Wärmeschrank stehende Wägegglas und bleibt dort genau 4 Stunden. Nach Ablauf von 4 Stunden wird das Wägegglaschen mit dem Deckel geschlossen, sofort in den Exsikkator gestellt und mitsamt Tiegel nach dem Abkühlen gewogen. Nötig ist dies sorgsame Arbeiten mit dem Wägegglaschen, weil das Furfurolphloroglucid stark hygroskopisch ist und frei an der Luft stehend sofort Wasser aufnimmt.

Durch Multiplikation des gefundenen Furfurolphloroglucidgewichtes mit 3 erhält man das Gewicht des entsprechenden Glukuronsäurelactons.

Die Gewichtszahl bedarf noch einer Korrektur, indem im Destillat + Waschwasser eine gewisse, genau berechnete Menge Phloroglucids gelöst bleibt. Es lösen sich in 550 ccm Destillat + Waschwasser gerade 0,0051—0,0052 g Phloroglucid. In 650 ccm 0,0060—0,0061 g. Diese Menge wäre also obigem Resultate noch hinzuzuaddieren je nach der Menge des Destillates.

Ergebnisse.

I. Tagesmengen Furfurolphloroglucids in normalen Urinen.

II. Versuche, zugesetzte Mengen Glukuronsäurelactons wiederzufinden.

III. Untersuchungen über die Mehrausscheidung von Glukuronsäure nach Eingabe von Natron salicylicum und von Terpinhydrat.

I.

Tagesmengen Furfurolphloroglucids in normalen Urinen.

Urin E.

Tag	Menge Spez. Gew.	Medika- ment	Phloroglucid- menge in 250 ccm g	Phloroglucid- menge im ganzen g	Glukuron- säurelacton (im besten Falle) g
19./4.	$\frac{1500}{1014}$	0	0,0227	0,1362	0,4086
20./4.	$\frac{2000}{1012}$	0	0,0226	0,1808	0,5424
21./4.	$\frac{1500}{1013}$	0	0,0284	0,1704	0,5112
26./4.	$\frac{2000}{1010}$	0	0,0232	0,1856	0,5568
27./4.	$\frac{1500}{1012}$	0	0,0293	0,1758	0,5274
Im Mittel . . .				0,1698	0,5094

Urin Z.

Tag	Menge Spez. Gew.	Medika- ment	Phloroglucid- menge in 250 ccm g	Phloroglucid- menge im ganzen g	Glukuron- säurelacton (im besten Falle) g
1.5.	$\frac{2000}{1012}$	0	0,0257	0,2056	0,6168
2.5.	$\frac{1500}{1013}$	0	0,0334	0,2004	0,6012
3.5.	$\frac{1000}{1016}$	0	0,0448	0,1792	0,5376
4.5.	$\frac{1250}{1014}$	0	0,0362	0,1810	0,5430
Im Mittel . . .				0,1916	0,5749

Auffallend ist in beiden Versuchsreihen die doch ziemlich konstante Menge der täglichen Furfurolphloroglucide resp. Glukuronsäuremengen des Urins.

II.

Versuche, zugesetztes Glukuronsäurelacton zu bestimmen.

Ich stellte zunächst die Phloroglucidmenge für 250 ccm eines durch Chloroformzusatz konservierten Urines fest. Zu anderen 250 ccm dieses selben Urines fügte ich dann die abgewogene Menge des Glukuronsäurelactons hinzu. Die Differenz zwischen dem jetzt gefundenen Phloroglucidwerte und dem ersten des reinen Urins gibt den Wert des aus dem zugesetzten Glukuronsäurelacton stammenden Furfurolphloroglucids an.

1. 250 ccm Urin Z. vom 13.—15. Mai liefern als Mittel von 5 Bestimmungen 0,0490 g Furfurolphloroglucid.

2. a) 250 ccm Urin Z. + 0,1090 g Glukuronsäurelacton (entsprechend 0,0363 Furfurolphloroglucid):

Gefunden: Phloroglucid	0,0832 g
	<u>— 0,0490 »</u>

Der Glukuronsäure entsprechen 0,0342 g

0,0342 entsprechen Glukuronsäure 0,1026 »

d. h. vom zugesetzten **94,11** %.

b) 250 ccm Urin Z. + 0,2086 g Glukuronsäurelacton (entsprechend 0,0695 Furfurolphloroglucid).

Gefunden: Phloroglucid	0,1178 g
	<u>— 0,0490 »</u>

Der Glukuronsäure entsprechen 0,0688 g

0,0688 entsprechen Glukuronsäure 0,2064 »

d. h. vom zugesetzten **99** %.

c) 250 ccm Urin Z. + 0,2628 g Glukuronsäurelacton (entsprechend 0,0876 Furfurolphloroglucid).

Gefunden: Phloroglucid	0,1352 g
	<u>— 0,0490 »</u>

Der Glukuronsäure entsprechen 0,0862 g

0,0862 entsprechen Glukuronsäure 0,2586 »

d. h. vom zugesetzten **98,4** %.

Ich habe noch eine Reihe weiterer Bestimmungen ausgeführt, die dasselbe ergaben. 100% des zugesetzten Lactons findet man, scheint es nicht, sondern annähernd 98—99% bei ganz genauem Arbeiten.

III.

Versuche zur Bestimmung der Mehrausscheidung gepaarter Glukuronsäuren nach Eingabe von Natron salicylicum und Terpinhydrat ($C_{10}H_{22}O_3$).

Ich habe diese Versuche bei Z. und E. angestellt, nachdem ich mehrere Tage hindurch die oben angegebenen Phloroglucidwerte bestimmt hatte.

1. Urin E.

Mittlerer Tageswert des Furfurophloroglucids: 0,1698 g

Tag	Menge	Medikament	Phloroglucid- menge in 250 ccm g	Phloroglucid- menge im ganzen g	Mehrausscheidung	
	Spez. Gew.				1. an Phloroglucid	2. an Glukuronsäure
					g	
22./4.	1500	3g Na. salicyl.	0,0432	0,2592	1. 0,0903	
	1014				2. 0,2709	
23./4.	2000	3g Na. salicyl.	0,0400	0,3200	1. 0,1511	
	1012				2. 0,4533	
24./4.	1000	3g Na. salicyl.	0,1138	0,4552	1. 0,2863	
	1021				2. 0,8589	
25./4.	1250	0	0,0650	0,3250	1. 0,1561	
	1017				2. 0,4683	
26./4.	2000	0	0,0232	0,1856		
	1010					

Am 26. April hatte der Phloroglucidwert annähernd wieder den normalen Stand erreicht, und es konnte die Beendigung der Glukuronsäuremehrausscheidung angenommen werden.

Die Gesamtmehrausscheidung gepaarter Glukuronsäuren während der Salicylperiode, in der 9g Na. salicylic. verabreicht wurden, betrug 2,0514 g!

Anscheinend steigt die täglich ausgeschiedene Menge der gepaarten Glukuronsäuren bei längerer Dauer des Salicylge-

brauches noch bedeutend an. Nicht nur zeigt die Tabelle E. eine tägliche Steigerung der Ausfuhr, sondern auch einige Proben, die ich mit dem Urine von Patienten anstellte, die bereits 2—3 Wochen Natr. salicylicum bekommen hatten, und die recht beträchtliche Mengen Furfurolphloroglucids im Urin aufwiesen.

So fand ich im Urin des Patienten K., der seit 2 Wochen Natr. salicylicum, täglich 3 g, bekam, als Tagesmenge 0,6212 g Furfurolphloroglucids. Nehme ich für den Urin K. ohne Salicylgebrauch als mittlere Tagesmenge Furfurolphloroglucids etwa 0,2 g an, nach Analogie von Z. und E., so bleibt eine Mehrausscheidung von mindestens 0,4 g übrig. Das entspräche einer Mehrausscheidung von 1,2 g Glukuronsäure im Urin! Es wäre dies eine erstaunlich hohe Zahl.

2. Urin Z.

Mittlerer Tageswert des Furfurolphloroglucides: 0,1913.

Tag	Menge Spez. Gew.	Medikament	Phloro- glucid- menge in 250 ccm g	Phloro- glucid- menge im ganzen g	Mehrausscheidung	
					1. an Phloroglucid	2. an Glukuronsäure
5./6.	1250	4 g Terp. hydrat.	0,0642	0,3210	1. 0,1297	
	1014				2. 0,3801	
6./6.	1250	4 g Terp. hydrat.	0,0690	0,3450	1. 0,1537	
	1017				2. 0,4611	
7./6.	2000	4 g Terp. hydrat.	0,0437	0,3496	1. 0,2583	
	1011				2. 0,7749	
8./6.	2000	4 g Terp. hydrat.	0,0712	0,5696	1. 0,3783	
	1010				2. 1,1349	
9./6.	1750	4 g Terp. hydrat.	0,0558	0,3906	1. 0,1993	
	1011				2. 0,5979	
10./6.	1500	0	0,0710	0,3550	1. 0,1637	
	1013				2. 0,4911	
11./6.	2000	0	0,0407	0,3256	1. 0,1343	
	1011				2. 0,4029	
13.— 15./6.	Im Mittel 1000 1019	0	0,0490	0,1960	—	

Dasselbe fand ich auch bei meinem weiteren Patienten H., der etwa 3 Wochen lang unter täglich 4 g Natr. salicyl. stand, als ich die Bestimmung machte. H. schied am ersten Versuchstage 2 g, am zweiten 1,5 g! Glukuronsäure aus. Also eine tägliche Mehrausscheidung von 1—1,5 g Glukuronsäure.

Ich möchte mich einstweilen auf diese Zahlen nicht festlegen, glaube aber, sie durch spätere Untersuchungen bestätigen zu können.

Eine weitere kleine Serie von Untersuchungen stellte ich an dem schon oben angeführten Z. an, der täglich 4 g Terpinhydrat bekam. (Siehe Tabelle S. 108.)

Die Gesamtmehrausscheidung gepaarter Glukuronsäuren während der Darreichung von 20 g Terpinhydrat betrug 4,2429 g!

Kolorimetrische, quantitative Bestimmung der Glukuronsäure im Urine vermittelt der Naphthoresorcin-Salzsäurereaktion: ¹⁾

Wie bereits oben erwähnt, gelingt es mit Hilfe der Naphthoresorcin-Salzsäurereaktion auf Glukuronsäure nach B. Tollens ziemlich genau, den Gehalt des Urines an Glukuronsäure festzustellen, vorausgesetzt, daß der Urin ziemlich reich an gepaarten Glukuronsäuren ist.

Stellt man nämlich mit demselben Urin mehreremale die Probe immer auf genau die gleiche Weise mit genau gleichen Mengen der Reagenzien und genau gleichen Flüssigkeitsquanten Urin, respektiv Urinverdünnungen an, so erhält man auch von diesem Urin genau gleich stark gefärbte Ätherschichten, d. h. die Färbung der Ätherschicht ist genau proportional der Menge der im Urin vorhandenen Glukuronsäure. Bei der vergleichenden Beurteilung der Farbe der Ätherschichten verschiedener Urine war mir nun zuerst die stark wechselnde Eigenfarbe des Urins, die beim Kochen mit Salzsäure sehr intensiv wird, sehr störend. Ich hielt deshalb eine kolorimetrische Mengenbestimmung der

¹⁾ C. Tollens, Diese Zeitschrift, Bd. LVI, H. 1 (1908). — Münchener med. Wochenschr., 1909, Nr. 13, S. 652. — B. Tollens, Zeitschr. d. Ver. d. D. Zuckerindustrie, Bd. LVIII, S. 629. — B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 1788 (1908).

Glukuronsäure im Urin von ziemlicher Genauigkeit zuerst nicht für angängig, sondern glaubte, nach dem Ausfall der Naphthoresorcin-Salzsäurereaktion nur sagen zu können, ob ein mehr oder weniger starker Gehalt des Urins an Glukuronsäure vorläge.¹⁾

Enthält nun aber der Urin reichlich gepaarte Glukuronsäuren, so fällt die Reaktion auch noch deutlich aus, wenn man den Urin stark mit Wasser verdünnt, und 5 ccm der Verdünnung zur Reaktion nimmt. Die Eigenfarbe des wenigen Urins der Verdünnung ist dann nur noch sehr gering, und nicht mehr störend.

Wie man sich an einer reinen Glukuronsäurelösung überzeugen kann, ist in einem Reagenzglase von 13 mm lichter Weite die untere Grenze der Sichtbarkeit der Reaktion sowohl bezüglich der Farbe der Ätherschicht, als auch des Absorptionsstreifens im Spezialapparat erreicht, wenn 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit 0,5—1 mg Glukuronsäure enthalten.

Danach verfährt man zur kolorimetrischen Bestimmung der Glukuronsäuremenge im Urin folgendermaßen:

Die erste orientierende Probe stellt man an mit:

5 ccm Urin,

0,5 ccm der 1%igen alkoholischen Naphthoresorcinlösung,

5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1190,

in einem Reagenzglase von 13 mm lichter Weite. Man kocht genau 1 Minute und läßt 4 Minuten absitzen. Gründlich abkühlen unter fließendem Wasser. Ausschütteln mit 10 ccm Äther. 1 Minute stehen lassen, dann Hinzufügen von 0,5 ccm Alkohol.

Fällt die Reaktion mit 5 ccm Urin stark positiv aus, nimmt man zur nächsten Reaktion:

3 ccm Urin

2 ccm Wasser, sonst dasselbe;

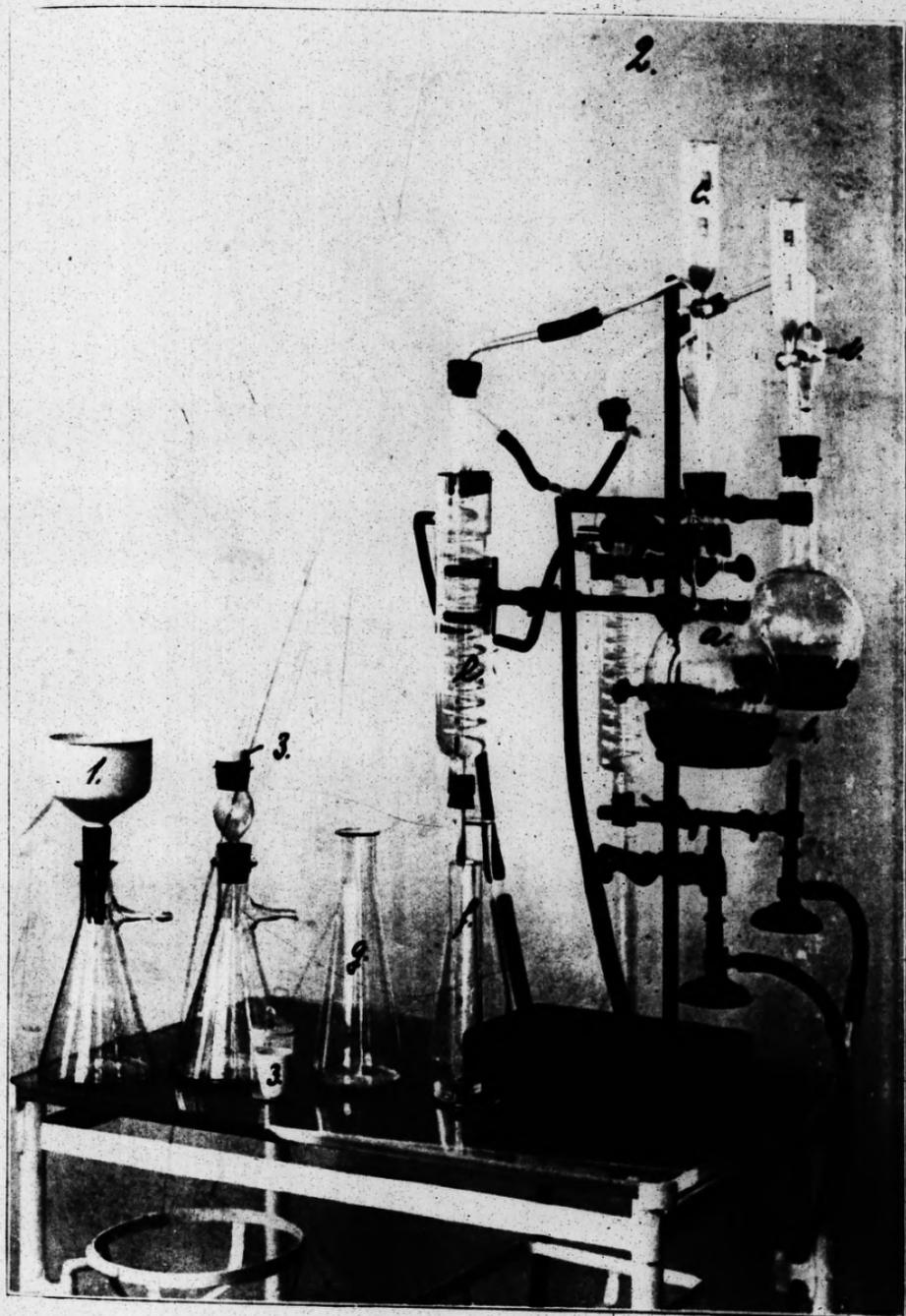
dann: 2 ccm Urin

3 ccm Wasser;

schließlich: 1 ccm Urin

4 ccm Wasser und so fort, bis die Reaktion eben noch positiv ist. Die zuletzt verwandte Urinmenge enthält dann etwa 0,5—1 mg Glukuronsäure.

¹⁾ Tollens, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 13, S. 654.



Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Band LXI, Tafel I.
Zur C. Tollens, Quantitative Bestimmung der Glukuronsäure im Urin mit der
Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode.

Beispiel.
 Urin Koch.

Tag	Menge Spez. Gew.	Naphthoresorcin- Salzsäurereaktion eben noch + mit cem Urin	Gesamtglukuronsäuregehalt	
			kolorimetrisch g	nach d. Furfurol- destillation g
13./4.	<u>2000</u>	1	1—2 (Mittel 1,5)	1,9
14./4.	<u>2500</u>	1	1,25—2,5 (Mittel 1,88)	1,539

Urin Z.

5./6.	<u>1250</u> <u>1014</u>	1	0,625—1,250 (Mittel 0,938)	0,963
6./6.	<u>1250</u> <u>1017</u>	1	0,625—1,250 (Mittel 0,938)	1,0350
7./6.	<u>2000</u> <u>1011</u>	1	1—2 (Mittel 1,5)	1,488
8./6.	<u>2000</u> <u>1010</u>	1	1—2 (Mittel 1,5)	1,6988
9./6.	<u>1750</u> <u>1011</u>	1	0,85—1,70 (Mittel 1,275)	1,1718

Das sind Zahlen, welche, wenn sie auch die Genauigkeit der vermittelt der Furfuroldestillation gewonnenen durchaus nicht erreichen, doch diese kolorimetrische Bestimmung als geeignet erscheinen lassen zur schnellen Orientierung über den ungefähren Glukuronsäuregehalt eines Urines.

Um dann die genaue Menge der Gesamtglukuronsäuremenge im Urin festzustellen, ist meiner Meinung nach die oben beschriebene Methode der Furfurolabspaltung aus dem Bleiniederschlag und die Wägung des Furfurolphloroglucids wohl geeignet. Sie erscheint leicht, genau und durchaus brauchbar für das klinische Laboratorium, und man kommt mit dieser allgemein, für alle gepaarten Glukuronsäuren verwendbaren Methode gewiß weiter, als mit polarimetrischen Bestimmungen.