XLVI.

Aus der II. medicinischen Klinik der Universität Berlin.

Ueber die Grenzen der Hippursäurebildung beim Menschen.

(Kritik einer Arbeit von Dr. Lewinski¹⁾ aus der Minkowski'schen Klinik, Greifswald, zugleich ein Beitrag zur Methodik der Hippursäurebestimmung.)

Von

Theodor Brugsch.

Im Centralblatt für Stoffwechselkrankheiten hatte ich 1907 eine kurze Mittheilung über die Rolle des Glykokolls beim Menschen im intermediären Stoffwechsel veröffentlicht, in der auch einige Versuche über die Hippursäureausscheidung nach Benzoessäureverfütterung beim Menschen wiedergegeben wurden. Ich fand nach Eingabe von 16,4 g Benzoessäure nur 4,92 g Hippursäure wieder und vermuthete deshalb, dass man beim Menschen durch Verfütterung von Benzoessäure nicht mehr Glykokoll dem Organismus entziehen kann, als man nach unseren Erfahrungen bei der Hydrolyse des Eiweiss über dessen Glykokollgehalt erwarten sollte.

Diese Arbeit hat Lewinski zum Ausgangspunkt seiner Untersuchungen genommen und seinerseits das Hippursäuresynthesevermögen des Menschen studirt.

Dabei kommt er dann zu folgenden Versuchsergebnissen.

Versuch I. Verabreicht 12 g Benzoessäure, wiedergefunden 12,48 (als Hippursäure) id est 104 pCt. der Einnahme.

Versuch II. Verabreicht 20 g Benzoessäure, wiedergefunden 19,92 g an Glykokoll gebundene Benzoessäure = 99,6 pCt. der Einnahme.

Versuch III. Verabreicht 25 g Benzoessäure, wiedergefunden 23,97 g als Hippursäure, als ungepaart 1,65 g, i. Sa. = 25,62 = 102,5 pCt. der Einnahme.

Versuch IV. Verabreicht 40 g Benzoessäure, wiedergefunden
als gebundene an Glykokoll = 27,61 g
als freie = 9,69 g.

Dazu kommt als Benzoessäureglykuronsäure (entsprechend dem Gehalt

1) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 58. 1908.

des Harns an 0,25 pCt. rechtsdrehender Substanz) = 4,18 g¹⁾. In Summa also wiedergefunden = 41,48 g = 103,7 pCt. der Einnahme.

Berechnet man dabei, dass bei gemischter Diät der Mensch etwa 0,7—1,0 g Hippursäure, also etwa 0,5—0,7 g Benzoessäure ausscheidet, so müssen wir zu dem Resultate kommen, dass Lewinski geradezu ideal gearbeitet haben muss.

Wie sticht er dabei ab gegen Autoren wie Harsveld u. Stokvis, die, wie Lewinski selbst citirt, an gesunden und nierenkranken Menschen durchschnittlich 50—60 pCt. Verluste der zugeführten Benzoessäure erhalten.

Und nun gar meine Versuche! Ich finde eine relativ so kleine Menge Hippursäure, dass sie sich ja nicht im entferntesten mit den Mengen von Lewinski messen kann. Seo²⁾ an der Minkowski'schen Klinik hat auch bereits die Erklärung dafür an der Hand:

„Derartige Verschiedenheiten in den Resultaten können selbstverständlich nur durch Versuchsfehler erklärt werden. Sofern es sich um Mängel der zur quantitativen Bestimmung angewandten Methoden handelt, so können diese durch Controlbestimmungen, durch Nachprüfungen und Vergleiche mit den Resultaten besserer Methoden allenfalls ermittelt werden. Sehr viel bedenklicher ist eine andere Fehlerquelle, weil diese im Einzelfalle in einem sehr verschiedenen und nachträglich nicht controlirbaren Grade sich geltend machen kann: das ist die Zersetzbarkeit der Hippursäure durch Fermente und Bakterien.“

Also die leichte Zersetzbarkeit der Hippursäure wäre bei mir anzuschuldigen!

Ich kannte die bezügliche Literatur sehr gut und wusste, dass in ammoniakalischen und eiweissreichen Harnen Hippursäure sich leicht zersetzt; die von mir untersuchten Harne waren indessen sauer, eiweissfrei und wurden frisch untersucht. Ich habe übrigens, um den Einfluss der Zersetzlichkeit der Hippursäure kennen zu lernen, 5 g Hippursäure zu 1 Liter hippursäurefreiem Harn zugesetzt, diese 24 Stunden offen stehen lassen und die Hippursäure in annähernd derselben Menge wiedergewonnen. Ich kann daher Seo versichern, dass das nicht die Differenz unserer Versuchsergebnisse ist.

Bleibt die Frage der Methodik. Ehe ich auf diese näher eingehe, möchte ich nur wenige Worte über die Möglichkeit einer mehr minder vollständigen Resorption von Benzoessäure sagen. Diese Möglichkeit liegt ja vor, ist indessen, wie mich neuere Versuche, auf die ich demnächst zurückkomme, gelehrt haben, nicht sehr gross, wenn man benzoesaures Natron verfüttert.

Hingegen kann schon eine gewisse Differenz in der Ausbeute der Hippursäure zu Stande kommen, wenn man, statt auf ein- oder zweimal die Benzoessäure zu geben, wie ich es in meinen früheren Versuchen gemacht habe, die Benzoessäure über den Tag vertheilt giebt. Das würde

1) Berechnet nach Magnus-Levy.

2) Ueber die Hippursäurespaltung durch Bakterien und ihre Bedeutung für den Nachweis von Benzoessäure und Glykokoll im Harne. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. 58. 1908.

indessen nicht die grossen Differenzen zwischen Lewinski und mir erklären können.

Es bleibt also an der Methodik hängen. Ich habe die Hippursäurebestimmung derart angestellt, dass ich den Alkoholextract des alkalisch eingedampften Urins vorsichtig abdampfte, mit Salzsäure zerlegt und, nachdem er mit Petroläther ausgeschüttelt worden war, mit Essigäther extrahirte. Den Essigäther liess ich in offener Schale verdampfen, verseifte den Rückstand durch mehrstündiges Kochen mit KOH am Rückflusskühler und unterwarf schliesslich die Benzoessäure nach Ansäuern der alkalischen Lösung durch Phosphorsäure der Dampfstromdestillation. Die Benzoessäure wurde dann gravimetrisch festgestellt. Das Verfahren wurde seiner Zeit von Wiechowski ausprobiert und ist fraglos für den Nachweis kleiner Mengen Benzoessäure bezw. Hippursäure vortrefflich. Bei grösseren Mengen scheinen nach meinen jetzigen Erfahrungen Verluste kaum vermeidlich, und so ist es auch durchaus möglich, ja wahrscheinlich, dass die Hippursäuremengen, die ich erhalten habe, zu klein ausgefallen sind. Indessen würde das immer noch nicht die grossen Differenzen zwischen mir und Lewinski erklären.

Lewinski verwandte das Schmiedeberg-Bunge'sche Verfahren der Hippursäurebestimmung. Da ich das Verfahren genau kenne und die Leistungsfähigkeit desselben geprüft habe, so kann ich nur sagen, dass ich nicht im Stande bin, mit der souveränen Sicherheit wie Lewinski die Hippursäure mit nur einem Verlust von 2 pCt. wiederzufinden. Reinigt man gar die Hippursäure durch Umkrystallisiren mit Thierkohle, so dass die Hippursäure rein krystallisirt, so erhält man zu kleine Werthe, oft sogar viel zu kleine Werthe; es ist deshalb ja auch die Bestimmung der Hippursäure als Benzoessäure nach Dampfstromdestillation vorgeschlagen worden.

Aber ganz abgesehen davon würde diese Methode bei der Verarbeitung grösserer Hippursäuremengen beim Menschen bisher noch als die relativ brauchbarste anzusehen sein und Lewinski's Resultate durchaus als einwandfrei anzusehen sein, wenn nicht — sich folgender unscheinbarer Passus bei Lewinski vorfände.

Lewinski sagt: „Zur Methode ist zu bemerken: der frisch entleerte Harn wurde in einer Vorlage gesammelt, in der sich 30 ccm Acid. carbol. liqu. befanden.“

Mit derartig carbolisirten Harnen stellt Lewinski die Hippursäurebestimmung nach Schmiedeberg-Bunge an! Lewinski hätte sich aber wohl Folgendes überlegen können: In Alkohol ist Carbol glänzend löslich, in Essigäther ebenso, wenn nicht noch besser! Bei der Anstellung der Hippursäurebestimmung in dieser Weise bei carbolisirten Harnen bekommt man unfehlbar Carbol in den Essigätherextract und wägt unfehlbar Carbol mit der Hippursäure. Das Schlimme ist, dass, wenn man nicht daran gedacht hat, einem sehr leicht dieser Umstand entgehen kann, wie er ja Lewinski völlig entgangen ist.

Ich habe in einem Versuche die Carbolsäure vor der Hippursäurebestimmung zugesetzt und dabei natürlich viel zu grosse Werthe gegenüber der Controlbestimmung erhalten.

Dadurch entziehen sich natürlich sämtliche Werthe Lewinski's der sicheren Beurtheilung. Die Versuche sind werthlos. Wie wunderbar hat bei Lewinski der Zufall mitgespielt, dass er ihn stets 100 pCt. der Benzoesäure wiederfinden liess!

Es lässt sich auch nicht dagegen einwenden, dass man den Harn eindampft und ebenso den Alkoholextract. Natürlich wird dabei mehr minder viel Carbol dabei entweichen, je nach dem Grade des Eindampfens, aber längst nicht alles, und eine Bestimmung, bei der man durch Zusatz von Substanzen, die in die Extractmittel hineingehen, sich ganz uncontrolirbare Verhältnisse schafft, darf man füglich nicht als chemisch bezeichnen.

Lewinski schreibt S. 399 seiner Arbeit:

„Zudem war es für die hier aufgeworfenen Fragen zweifellos von Vorthail, dass bei dieser Methode die Hippursäure in Substanz zur Darstellung gelangt, so dass eine Identificirung der gewonnenen Substanz und eine Controle ihrer Reinheit jederzeit leicht möglich war.“

Weder aber findet man in dem Protokolle seiner Versuche etwas über Schmelzpunktsanalyse, noch über Analyse des N-Gehaltes der Substanz. Ich habe gerade bei der Analyse des Schmelzpunktes in dem à la Lewinski angestellten Versuche Carbolsäurekrystalle und Hippursäurekrystalle durch ihre verschiedenen Schmelzpunkte differenziren können.

Zur Fortsetzung der von mir begonnenen und s. Zt. auch in Aussicht gestellten Versuche hatte ich Herrn Dr. Tsuchiya aufgefordert, der sich dieser Mühe unterzogen hat und dessen Methode, wie ich mich persönlich überzeugt habe, einwandfrei war. Seine Resultate substituiren daher die Lewinski'schen, die sich in jeder Weise einer wissenschaftlichen Beurtheilung entziehen¹⁾.

Schliesslich möchte ich mir noch einige Bemerkungen zur Bestimmung der Hippursäure beim Menschen gestatten. Ich bin dazu angeregt durch Magnus-Levy's Untersuchungen über die Benzoe-Glykuronsäure.

Zur Bestimmung der Gesamtbenzoesäure beim Menschen reicht nach unseren jetzigen Erfahrungen die Schmiedeberg-Bunge'sche Methode nicht aus, da in den Alkoholextract zwar ein Theil der Benzoesäure-Glykuronsäure hineingeht, der alsdann als freie Benzoesäure bestimmt wird, z. Th. aber auch in dem Rückstand bleibt²⁾.

Magnus-Levy schlägt deshalb für benzoesäure- und hippursäurereiche Urine vor, den Urin auf $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{6}$ einzudampfen und ihn mit kleinen Mengen Schwefelsäure zu fällen und die ausgefallene Hippursäure nach Trocknung und Waschung zu wägen. Das Filtrat mit Aether zu extrahiren und den Aetherextract weiter auf freie Benzoesäure (die z. Th. vielleicht auch noch aus der Glykuronsäure-Benzoesäure stammen mag) und Hippursäure zu verarbeiten. Auf diese Weise sollen sich die Hippursäure und freie Benzoesäure am besten trennen lassen.

1) Siehe die Arbeit von Dr. Tsuchiya in diesem Hefte.

2) Es sei hier auch ausdrücklich betont, dass durchaus nicht immer in den Alkoholextract die gesammte Hippursäure bezw. Benzoesäure (freie) hineingeht!

Ich habe das Verfahren geprüft und möchte es für menschliche Harnen dahin modificiren, dass man den (hippursäurereichen) Harn event. bei nicht zu stark alkalischer Reaction nur so weit eindampft, dass seine Concentration ca. (und wenigstens) 1 proc. Hippursäure beträgt. Zu 100 ccm Harn setzt man dann 5 ccm conc. H_2SO_4 und lässt 24 Stunden auf Eis stehen; dann fällt die Hippursäure in schönen langen Nadeln (zu 80—90 pCt. der Gesamtmenge) aus; diese Hippursäure wird abgenutscht und mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet, dann mit Petroläther mehrmals gewaschen, getrocknet (und provisorisch gewogen).

Das Filtrat (Urin + Waschwasser) wird 5 mal mit Aether ausgeschüttelt, der Aether einige Male mit Wasser gewaschen, das zu dem Filtrat zurückgegossen wird. Den Aether lässt man in flacher Schale abdunsten, extrahirt mit Petroläther (5×20 ccm). (Man benutzt den zur Reinigung der Hippursäure gebrauchten.) Der Petroläther wird im Schütteltrichter mehrmals mit Barytwasser ausgeschüttelt, das Barytwasser mit Phosphorsäure angesäuert und der Dampfstromdestillation unterworfen. Das Destillat kann titirt und auf Benzoessäure berechnet werden (freie Benzoessäure). Der Rückstand in der Porzellanschale wird in 100 ccm Wasser aufgenommen und zusammen mit der ersten (bereits provisorisch gewogenen) Hippursäure dann unter Zusatz von 100 ccm concentrirter H_2SO_4 der Dampfstromdestillation unterworfen. Das Destillat kann wieder titirt und auf Benzoessäure (als gebundene) bezw. Hippursäure berechnet werden. (Besser ist die gravimetrische Bestimmung.)

Um nun die Gesamtbenzoessäure zu bestimmen, verfährt man nach dem Vorbilde von Pfeiffer, Bloch und Riecke¹⁾, indem man den Harn bei einer Concentration von 50 pCt. H_2SO_4 destillirt. Man muss es indessen aber nicht so machen, wie z. B. auch Seo es angestellt hat, dass man einfach destillirt und dann, wenn sich die Concentration geändert hat, wieder H_2O zusetzt und wieder destillirt, sondern einfacher und sicherer so, dass man den Harn bei einer Concentration von 50 pCt. H_2SO_4 , die sich während des ganzen Versuches völlig aufrecht erhalten lässt, der Dampfstromdestillation unterwirft. Man destillirt dabei 2 Liter Wasser durch indem man in die Vorlage Na_2CO_3 giebt, dampft das alkalische Destillat ein und extrahirt mit Petroläther in einer Extractionsflasche, nachdem man mit HCl angesäuert hat. Der Petroläther wird in entsprechender Flasche abgeblasen und die Benzoessäure gewogen (vergl. Wiechowski, Hofmeister's Beiträge. Bd. VII).

Auf diese Weise erhält man dann 1. die Gesamtbenzoessäure, 2. die an Glykokoll gebundene und 3. die ungebundene Benzoessäure, als Differenz die Glukuronsäure-Benzoessäure.

Man kann statt dessen auch das Filtrat der Hippursäure, das mit Aether mehrmals extrahirt wurde, der Dampfdestillation unterworfen, nachdem man noch concentr. H_2SO_4 (bis zur Concentr. von 50 pCt.)

1) Mittheilungen des landwirthschaftlichen Instituts der Universität Breslau. II. 237—293. 1905.

zugesetzt hat; danu erhält man im Destillat die Glukuronsäure-Benzoesäure als Benzoessäure.

Diese Methodik der Hippursäure-Benzoesäure- und Glykoronsäurebenzoessäurebestimmung dürfte sich als die quantitativste und einwandsfreieste bei grösseren Benzoessäure- bzw. Hippursäuremengen empfehlen.

Auch bei der Schmiedeberg-Bunge'schen Hippursäurebestimmung dürfte es sich empfehlen, nach Verdunstung des Essigäthers und nach Extraction des Rückstandes mit Petroläther die Hippursäure, statt sie mit Thierkohle zu reinigen, der Dampfstromdestillation in einer Concentration von 50 pCt. H_2SO_4 zu unterwerfen und das Destillat in oben angegebener Weise gravimetrisch oder titrimetrisch zu bestimmen.

Nach der oben angegebenen Weise habe ich nun bei einem Patienten, dem 30 g Na. benzoicum verabreicht worden waren, im Harn (2 Liter) an Gesamtbenzoessäure wiederfinden können:

Durch Dampfstromdestillation mit 50 pCt. H_2SO_4

= 22,2 g Benzoessäure (das sind rund 90 pCt. der Einnahme).

An freier Benzoessäure = 0.

An glykokollgebundener Benzoessäure = 11,6 g.

Mithin waren als Benzoessäureglykuronsäure vorhanden =

10,6 g Benzoessäure = 43 pCt. der aufgenommenen Benzoessäure und 47,7 pCt. der ausgeschiedenen Benzoessäure.

Da nunmehr auf diese Weise eine exacte Trennung der drei Fractionen möglich geworden ist, verdient die Frage der Benzoessäurebindung im Organismus erneutes Interesse; ich habe gemeinsam mit Dr. Tsuchiya die Versuche darüber aufgenommen und werde in Kürze darüber berichten. (Die Versuche sind bereits abgeschlossen und werden im nächsten Heft dieser Zeitschrift publicirt.)