

3. Auf Physiologie und Pathologie bezügliche Methoden.

Vor

K. Spiro.

Harnuntersuchung. Zuckernachweis. Seit der fruchtbaren Kritik, welche E. Pflüger an den Methoden zum Nachweis des Zuckers geübt hat, ist das Interesse für diese Frage sehr rege geblieben. Zuerst sei hier Sahli¹⁾ erwähnt, der umfangreiche Untersuchungen über die Pavy'sche Methode angestellt hat. Er fand, dass diese alle anderen quantitativen Bestimmungen an leichter Ausführbarkeit, Bequemlichkeit und Raschheit übertrifft, wenn man folgende Punkte berücksichtigt, die bisher meist übersehen wurden: Man muss stark verdünnen, nur gelinde sieden lassen und einen Kolben von etwa 75—100 cc verwenden, der nicht luftdicht mit der Bürette verbunden sein muss. Sahli verdünnt das Gemenge von je 5 cc der beiden Reagenzien (Seignettesalz-Kali-Ammoniaklösung und Kupfersulfatlösung) mit 30 cc Wasser und verdünnt den Harn so, dass er ungefähr $\frac{1}{2}$ —1 0/0 Zucker enthält.

Eine eigentümliche Hemmung der Nylander'schen Zuckerreaktion hat H. Bechhold beobachtet.²⁾ Im Harn eines Bakteriologen, der zur Händedesinfektion viel mit Sublimat gearbeitet hatte, und ebenso im Harn von mit Quecksilber behandelten Syphilitikern versagte die Reaktion, auch wenn Zucker zugesetzt war. Nicht so stark verzögert wie nach Quecksilberpassage durch den Organismus war die Zuckerreaktion, wenn zu normalem Harn Sublimat oder organische Quecksilberverbindungen zugesetzt wurden. Auch andere Stoffe setzen die Empfindlichkeit der Nylander'schen Probe herab, so Eiweiss, Thymol, Albumosen und Chloroform. Die Probe nach Fehling oder Trommer wird durch Quecksilberverbindungen nicht beeinflusst.

Die Gärungsprobe zum Nachweis von Zucker hat E. Salkowski³⁾ neuerdings eingehend studiert. Er hebt hervor, dass während die Reduktionsproben auf einer nicht typischen Eigenschaft der Glykose beruhen, die Vergärbarkeit für diese typisch ist, und dass deswegen und wegen der hohen Empfindlichkeit (0,1—0,05 0/0 Traubenzucker) diese Probe im Gegensatz zu dem, was Pflüger ausgeführt hat, am besten zum Nachweis von Zucker zu benutzen ist. Er nimmt 15 cc Harn, 0,5—0,8 g Presshefe, schliesst mit Quecksilber ab und lässt

1) Deutsche medicin. Wochenschrift **31**, 1417.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie **46**, 371.

3) Berliner klin. Wochenschrift, Festschrift für C. A. Ewald, 48.

bei einer Temperatur von 30—38° etwa 20—22 Stunden stehen; zur Kontrolle empfiehlt es sich, auf etwa 70° zu erwärmen, um die in der Flüssigkeit gelöste Kohlensäure zu entfernen. Kohlensäureentwicklung bei saurer Reaktion beweist unter allen Umständen gärunsfähigen Zucker, ist dagegen der Harn alkalisch geworden, so müssen die Proben verworfen werden. In zweifelhaften Fällen ist der Harn vor dem Versuch zum Sieden zu erhitzen, ist er dabei alkalisch geworden oder geblieben, so ist er vorsichtig mit ganz verdünnter Salzsäure oder Weinsäure anzusäuern und die Kohlensäure durch Erhitzen auszutreiben. Bei der ammoniakalischen Gärung verschwindet der Zucker schnell.

Als einfache und genaue Methode der Zuckerbestimmung empfiehlt Jos. Bilinski¹⁾, bei der Titration mit Fehling'scher Lösung zu dem Gemisch von letzterer und Harn, (der durch Zusatz von Urannitrat geklärt ist) einige Tropfen vierprozentiger Urannitratlösung zuzufügen. Ist beim Erhitzen alles Kupferoxyd reduziert, so wird bei Gegenwart der kleinsten überschüssigen Zuckermenge auch das Uranoxyd reduziert und dieses verleiht dem ausgefällten Kupferoxydhydrat eine grüne, respektive bräunliche Färbung: 50 cc Harn werden mit soviel (10—20 cc) Urannitratlösung versetzt, dass ein Tropfen dieser Mischung pulverisiertes Ferrocyankalium braunrot färbt; dann wird mit destilliertem Wasser auf 100 cc aufgefüllt, filtriert und in einem aliquoten Teil dieses Gemisches annähernd die Zuckermenge bestimmt. Zur genauen Bestimmung wird der Harn je nach der vorhandenen Zuckermenge verdünnt (am besten auf 15⁰/₁₀₀) und nun die exakte Grenze durch Zufügung kleiner Harnmengen (0,1 cc) festgesetzt. Ausser zur Klärung kann die Uranlösung auch zur Konservierung von Harn benutzt werden.

Neue Apparate zur quantitativen Bestimmung des Zuckers mittels der Gärungsprobe haben B. Wagner²⁾ und H. Citron³⁾ angegeben. Während der Wagner'sche Apparat auf demselben Prinzip beruht wie der Lohnstein'sche, nur dass dafür gesorgt ist, dass die Gärflüssigkeit nicht mit dem Quecksilber in Berührung kommt (der Apparat »Gärungs-Saccharo-Manometer« ist zu beziehen von F. O. R. Götze in Leipzig), ist das »Gär-Saccharoskop« von Citron nach folgendem Prinzip gebaut. Die Spindel ist gross, sein oberes Ende zum Knie gebogen, das mit einer Federpose auf eine seitliche Skala

1) Monatshefte f. Chemie **26**, 133.

2) Münch. medicin. Wochenschrift **52**, 2327.

3) Deutsche medicin. Wochenschrift **31**, 1753.

zeigt, so dass die Ablesung aussen stattfindet. Die Skala ist so graduiert, dass sie die Zuckerprozentzahlen von 0—10 in $\frac{1}{10}\%$ geteilt direkt angibt. Das Gärungsgefäß, ein verzinnter Messingzylinder, ist mit einer Längsrinne versehen, in der eine Röhre auf und ab verschiebbar angeordnet ist. Die Röhre nimmt ein kleines Thermometer auf und läuft unten in eine Platte mit einem Borstenkranz aus. Auf diese Weise kann Rührer und Thermometer während des ganzen Versuchs neben der Spindel im Apparat bleiben, auch braucht die Spindel während des Umrührens nicht entfernt, sondern nur ein wenig angehoben zu werden, wodurch Verlust von Flüssigkeit vermieden wird. Die durch Temperaturänderung notwendig werdende Umrechnung besorgt ein »Korrektor« auf automatischem Wege. Dieser besteht aus zwei parallel angeordneten Skalen, von denen die eine bewegliche die Zahl 0, darüber und darunter. + respektive — 0,1—0,8, die andere die festen Temperaturgrade von 10—70 enthält. Zu Beginn des Versuchs ist der Nullpunkt auf die jeweilige Temperaturzahl einzustellen und der Korrektionswert nachher abzurechnen. Der Apparat, der sich in der Praxis bewährt hat, ist zu beziehen von R. Kallmeyer und Co., Berlin N., Oranienburgerstrasse 45 und kostet 27 Mark.

Für den Nachweis der Fruktose hatte bisher die Kütz'sche Beobachtung gegolten, dass dieser Zucker, dem Harn zugesetzt, nicht durch Bleiessig gefällt werde. Rudolf Adler und Oscar Adler¹⁾ zeigen aber, dass bei Fällung des Harns mit Bleiessig, sowohl in einem Fall von Lävulosurie als auch bei künstlichem Zusatz von Fruchtzucker zu normalen oder pathologischen Harnen, Lävulose, mitunter sogar in beträchtlicher Menge, zurückbehalten wird.

Eine neue Methode zum Nachweis der Pentosen im Harn gründet Ad. Jolles²⁾ in folgender Weise auf die Reaktionsfähigkeit des Osazons. 10—20 cc Harn werden mit entsprechenden Mengen Natriumazetat und salzsaurem Phenylhydrazin versetzt, zirka 1 Stunde im Wasserbad gekocht und dann 2 Stunden in kaltem Wasser stehen gelassen. Der entstandene Niederschlag wird auf ein Asbestfilter gebracht, einmal mit kaltem Wasser ausgewaschen und dann Filter samt Inhalt in ein Destillationskölbchen gebracht. Hierauf fügt man 20 cc destilliertes Wasser und 5 cc konzentrierte Salzsäure hinzu und destilliert zirka 5 cc in eine in kaltem Wasser befindliche Eprouvette ab, welche vorher

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. zu Berlin **38**, 1164.

2) Zentralbl. f. innere Medizin **26**, 1049.

mit 5 cc destilliertem Wasser beschickt wurde. Bei Gegenwart von Pentosen gibt 1 cc des Gemenges beim Kochen mit 4 cc des Bialischen Reagens (1 g Orzin in 500 cc konzentrierter Salzsäure, dazu 20—30 Tropfen 10-prozentiger Eisenchloridlösung) infolge des gebildeten Furfurols intensive Grünfärbung. — Mit Vanillinsalzsäure liefert Pentosazon intensive Rotfärbung. Für den Nachweis mit Orzin muss 1 cc Harn mit 4—5 cc des Orzin-Reagens aufgeköcht und etwa 1—2 Minuten im Kochen erhalten werden.

Die quantitative Bestimmung gepaarter Glykuronsäuren nach C. Neuberger und Wilh. Neimann¹⁾ beruht darauf, dass die frei werdende Glykuronsäure sofort in eine beständige Form, nämlich durch Bromwasser in Zuckersäure übergeführt wird. Das lässt sich quantitativ erreichen durch dreistündiges Erhitzen mit 1—3-prozentiger Bromwasserstoffsäure und Brom im Rohr bei 100°. Etwaige Bromsubstitutionsprodukte (zum Beispiel substituierte Phenole) werden abfiltriert, die Zuckersäure aus der eingedampften Lösung mit Barytwasser ausgefällt und bromfrei gewaschen, der Niederschlag dann mit Ammoniumkarbonat und etwas Ammoniak eine halbe Stunde erwärmt, das Filtrat vom ausgeschiedenen Baryumkarbonat zweimal zur Entfernung der flüchtigen Ammonverbindungen eingedampft. Die auf 3—5 cc eingeeengte Flüssigkeit wird mit konzentrierter Silbernitratlösung gefällt: das d-zuckersaure Salz wird im Gooch-Tiegel mit 50- und 96-prozentigem Alkohol ausgewaschen und im Vakuumexsikkator zur Gewichtskonstanz getrocknet. Für Harn empfiehlt sich eine vorherige Fällung mit Barytwasser, Entfernen des Baryums durch Kohlensäure und Eindampfen auf 5—8 cc; gepaarte Schwefelsäuren stören dabei nicht. Während bei wichtigen natürlichen Glykuronsäuren bis 95% der Theorie erhalten wurde, ist die Methode bei Euxanthinsäure, Mentholglykuronsäure und Urochloralsäure nicht quantitativ. B. Tollens²⁾ macht gegenüber dieser Methode geltend, dass die von ihm angewandte Bestimmungsart (Furfuroldestillation), wenn man die reinen gepaarten Glykuronsäuren abgeschieden hat, zur annähernden Bestimmung brauchbare Zahlen liefert. Doch sieht C. Neuberger³⁾ gerade darin einen grossen Vorzug seiner Methode, dass die gepaarten Glykuronsäuren

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie **44**, 127.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie **44**, 388.

3) Zeitschrift f. physiol. Chemie **45**, 183.

nicht erst isoliert werden müssen, und dass sie auch bei Gegenwart von Pentosanen und Nukleoproteiden anwendbar ist.

Nach V. Frommer¹⁾ wird zum Nachweis von Azeton der alkalisch gemachte Harn mit einigen Tropfen einer 10-prozentigen alkoholischen Lösung von Salizylsäurealdehyd auf zirka 70° erwärmt, wodurch bei Gegenwart des Ketons ein purpurroter Ring auftritt.

Die Riegler'sche Methode zum Nachweis der Azetessigsäure im Harn hat Ludw. Lindemann²⁾ in folgender Weise modifiziert: Man säuert 10 cc des Harns mit 5 Tropfen verdünnter Essigsäure an, setzt 5 Tropfen Jodjodkaliumlösung hinzu, schüttelt gut durch und gibt 2 cc Chloroform hinzu. Bei Anwesenheit von Azetessigsäure bleibt das letztere farblos, während es sonst durch das Jod rot gefärbt wird. Die Reaktion, deren Wesen noch nicht klar ist, — um Jodoformbildung scheint es sich nicht zu handeln — ist empfindlicher als die Eisenchloridreaktion und hat vor dieser den Vorzug; auch eindeutiger, zum Beispiel Salizylsäure gegenüber, zu sein.

Mit dem Nachweis des Indikans im Harn haben sich E. Nicolas³⁾ und A. Gürber⁴⁾ beschäftigt. Ersterer benutzt die Reaktion des Indikans mit Furfurol: wird indikanhaltiger Harn mit einigen Tropfen einer gesättigten wässrigen Furfurolösung und dem gleichen Volumen Salzsäure versetzt und dann langsam mit Chloroform geschüttelt, so zeigt letzteres eine deutliche grüne Fluoreszenz. A. Gürber hat in einprozentiger Osmiumsäurelösung ein Oxydationsmittel angegeben, das Indigo nicht weiter oxydiert, daher sehr bequem zu handhaben ist. 5 cc Harn, der wenn stark gefärbt, mit $\frac{1}{8}$ Volumen Bleiessig zu fällen ist, werden mit dem doppelten Volumen konzentrierter Salzsäure und 2—3 Tropfen einprozentiger Osmiumsäure versetzt, gut gemischt und ohne heftiges Schütteln mit 4—5 cc Chloroform ausgezogen.

Die früher viel angewandte, dann wieder verlassene Methode der Bestimmung von Harnsäure und Purinbasen als Kupferoxydulverbindungen hat der inzwischen leider früh verstorbene Martin Krüger in Gemeinschaft mit Jul. Schmid⁵⁾ eingehend und mit Erfolg geprüft. Sie konnten zeigen, dass die Fällung von Harn-

1) Berliner klin. Wochenschrift **54**, 1008.

2) Münchener mediz. Wochenschrift **52**, 1386.

3) Bull. de la soc. chim. de Paris **33**, 743.

4) Münchener mediz. Wochenschrift **52**, 1578.

5) Zeitschrift f. physiol. Chemie **45**, 1.

säure und Purinbasen durch das Kupferreagens vollständig ist, und dass die zur Abscheidung der Harnsäure nötigen Manipulationen bei den Purinbasen keine Veränderung erzeugen; sie sind auf Grund ihrer Versuche zu folgender Bestimmungsmethode ¹⁾ gekommen: 400 *cc* Harn werden in einem Literrundkolben mit 24 *g* Natriumazetat und 40 *cc* käuflicher, konzentrierter Natriumbisulfatlösung versetzt, zum Kochen erhitzt und nach Zusatz von 40—80 *cc* (je nach dem Gehalt von Purinkörpern) 10-prozentiger Kupfersulfatlösung mindestens 3 Minuten im Sieden erhalten. Der entstandene flockige Niederschlag wird sofort oder nach dem Abkühlen der Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtriert, mit heissem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft, und schliesslich mit heissem Wasser in den Kolben, in dem die Fällung vorgenommen war, zurückgespült. Man fügt so viel Wasser hinzu, dass die Flüssigkeitsmenge etwa 200 *cc* beträgt, erhitzt zum Sieden und zersetzt den Kupferoxydulniederschlag durch Hinzufügen von 30 *cc* Natriumsulfidlösung. Von der Vollständigkeit der Fällung hat man sich zu überzeugen, indem man einen Tropfen der Flüssigkeit auf ein mit einem Tropfen Bleiazetat befeuchtetes Stück Filtrierpapier bringt (Braunfärbung soll einen Überschuss von Schwefelnatrium anzeigen). Nach völliger Zersetzung säuert man mit Essigsäure an, erhält noch so lange im Sieden, bis der ausgeschiedene Schwefel sich zusammengeballt hat, filtriert siedend heiss mit Hilfe der Saugvorrichtung und unter Benutzung einer Porzellanfiltrierplatte, wäscht mit heissem Wasser aus und dampft das Filtrat in einer 300 *cc* fassenden Glasschale bis auf 10 *cc* ein. Während des Einengens und des darauf folgenden zwei-stündigen Stehens scheidet sich die Harnsäure ab, während die Purinbasen in Lösung bleiben. Die abgeschiedene Harnsäure wird durch ein kleines Filter filtriert, mit schwefelsäurehaltigem Wasser ausgewaschen, bis Filtrat und Waschlösung 75 *cc* betragen. Zu der aus dem gefundenen Stickstoff-Wert durch Multiplikation mit 3 berechneten Harnsäure sind noch 3—5 *mg* hinzuzufügen. Das Filtrat von der Harnsäure wird mit Natronlauge alkalisch, darauf mit Essigsäure schwach sauer gemacht, nach Erwärmen auf 70° oder einige Grade darüber mit $\frac{1}{2}$ —1 *cc* 10-prozentiger Essigsäure und 10 *cc* Brauneinaufschwemmung (die Aufschwemmung von Braunstein in Wasser wird in folgender Art hergestellt: Eine heisse 5-prozentige Permanganatlösung wird mit Alkohol bis zur

¹⁾ H. Thierfelder, Hoppe-Seyler's Handbuch der physiol. u. pathol.-chemischen Analyse, Berlin, 7. Aufl., S. 435.

Entfärbung behandelt) versetzt und eine Minute geschüttelt, man fügt jetzt 10 cc der Bisulfidlösung hinzu, welche gleichzeitig den überschüssigen Braunstein löst, und 5—10 cc der 10-prozentigen Kupfersulfatlösung, erhält die Flüssigkeit 3 Minuten im Sieden, filtriert den Niederschlag sofort durch ein Faltenfilter (schwedisches Papier, J. H. MunkteU No. 1), wäscht mit heissem Wasser aus und bestimmt den Stickstoff der gesamten Purine nach Kjeldahl.

Der Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn ist von Fr. W. Schildbach¹⁾ und von Alex. Raphael²⁾ geprüft worden. Ersterer erklärt die Riegler'sche Probe (Rotfärbung einer alkoholischen Chloroformlösung der Gallenpigmente mit Paradiazobenzen) für überflüssig, da sie der Huppert'schen an Empfindlichkeit und Deutlichkeit nachsteht, letzterer fand, dass, wenn man 2—3 Tropfen Natriumnitritlösung und 5 cc Sulfanilsäurelösung zu 5 cc Harn setzt, zunächst eine amethyst-, dann eine kirschrote Färbung auftritt, fügt man zu den 2—3 Tropfen Nitritlösung erst den Harn dann die Sulfanilsäure, so erhält man gelbgrüne Färbung, die dann in kirschrot übergeht.

Die im Harn vor 10 Jahren von Gottlieb, Bondzynski, Cloëtta etc. gefundene Oxyproteinsäure (Uroprotsäure) haben E. Abderhalden und Fr. Pregl³⁾ in der Art isoliert, dass sie aus dem Alkoholextrakt des Harns den Harnstoff durch Oxalsäure, diese durch Baryt, letzteren wieder durch Schwefelsäure quantitativ entfernten und dann maximal dialysierten. Das Produkt lieferte erst nach der Hydrolyse Aminosäuren, und zwar Glykokoll, Alanin, Leuzin, Glutaminsäure, Phenylalanin und wahrscheinlich Asparaginsäure; es handelt sich also um ein dem totalen Abbau entgangenen Eiweissabkömmling. Gleichzeitig zeigte E. Salkowski,⁴⁾ dass der aus dialysiertem Harn durch Alkohol fällbare Niederschlag kein einheitlicher Körper ist, sondern aus mindestens zwei, durch ihren Stickstoffgehalt verschiedenen Stoffen besteht, von denen der eine vermutlich eine durch Säure leicht hydrolysierbares, von Ptyalin nicht angreifbares, stickstoffhaltiges kohlehydratartigen Verbindung darstellt.

Paul Ehrlich hat zuerst für den Harn gezeigt, dass er mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in saurer Lösung Färbung gibt,

1) Zentralbl. f. innere Medizin **26**, 1097-

2) St. Petersburg. medicin. Wochenschrift **30**, 128.

3) Zeitschrift f. physiol. Chemie **46**, 19

4) Berliner klin. Wochenschrift **54**, Nr. 52.

die, wie O. Neubauer zeigte und Rich. Bauer¹⁾ bestätigte, (auch für den alkoholischen Fäzesextrakt) auf der Anwesenheit von Urobilinogen beruht. Die Reaktion tritt auch, wie O. Neubauer fand, zwischen Eiweisskörpern und dem Aldehyd ein, und wird nach Erwin Rohde²⁾ am besten in folgender Form angestellt: Zur Lösung der Aufschwemmung von Eiweiss fügt man im Reagensglas 5—10 Tropfen einer 5-prozentigen Lösung des Aldehyds in 10-prozentiger Schwefelsäure und setzt vorsichtig unter häufigem Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure bis zum Auftreten der Färbung zu, diese ist violett, nach kurzer Zeit dunkelviolett mit einem Absorptionsstreifen im Spektrum bei λ 615—570. Wie der genannte Aldehyd wirken auch andere aromatische Aldehyde aber nicht solche der Fettreihe, am besten p-Nitrobenzaldehyd (grün) und Vanillin (rot). Eine Verschärfung der Reaktion erzielt man, wenn man mit einer frischen Lösung von 1 Teil Aldehyd in 100 Teilen konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Haben die Eiweissstoffe vorher mit Aldehyd reagiert, so tritt die Reaktion nicht mehr ein. Von Eiweissen reagieren nicht Leim und Jodproteine. Von Eiweisspaltungsprodukten reagiert nur Tryptophan, das als eigentlicher Träger der Reaktion aufzufassen ist.

Eine sehr empfindliche Reaktion des Formaldehyds und der sauerstoffhaltigen Stickstoffverbindungen, welche gleichzeitig eine Farbenreaktion der Eiweissstoffe ist, beschreibt E. Voisenet³⁾. Versetzt man Eiweisslösung mit etwas salpetrige Säure enthaltender Salzsäure oder Schwefelsäure bei Gegenwart von Spuren von Formaldehyd (1:10 000 000) so färbt sich die Flüssigkeit violettrosa bis blau; bei gleichbleibender Eiweissmenge gibt es ein Optimum des Formaldehydzusatzes, während ein Überschuss von letzterem die Reaktion hindert; ebenso schadet ein Überschuss von Nitrit, aber nicht ein solcher von Eiweiss. Voisenet sieht die reagierende Gruppe im Tryptophan, dessen Oxydationsprodukte die Reaktion zeigen. Leim, Keratin und die peptischen albumosenfreien Produkte geben die Reaktion nicht, wohl aber die pankreatischen Verdauungsprodukte. Die Reaktion eignet sich ebenso zum Nachweis von Formaldehyd in Milch wie von Eiweiss im Harn.

1) Zentralbl. f. innere Medizin **26**, 833.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie **44**, 161.

3) Bull. de la soc. chim. de Paris **33**, 1198.