

## Zur Kenntniss der aromatischen Substanzen des Thierkörpers.

Von Privatdocent Dr. **E. Baumann** in Strassburg.

(Aus dem physiol.-chem. Institute.)

Von den unter normalen Verhältnissen im Harn von Säugethieren vorkommenden aromatischen Aetherschwefelsäuren habe ich bis jetzt die Phenyl<sup>(1)</sup> und eine Kresylschwefelsäure<sup>(2)</sup> in ihren Kaliumsalzen darstellen können; derselben Klasse von Verbindungen sind eine im Pferdeharn constant vorkommende Aetherschwefelsäure des Brenzcatechins<sup>(1)</sup> und das Indican<sup>(1)</sup> zuzurechnen.

Die beiden erstgenannten Substanzen, welche man früher als «phenolbildende Substanz» bezeichnet hat, sind zwar ihrer chemischen Constitution nach genau gekannt und können auf einfache Weise synthetisch dargestellt werden; über die Art und Weise ihrer Entstehung im Thierkörper wissen wir aber bis jetzt noch wenig. Ueber dieselbe ist nur bekannt, dass das reichliche Vorkommen derselben im Harn nach Pflanzenkost durch die letztere bedingt ist. Die Production derselben im Thierkörper ist aber auch qualitativ und quantitativ abhängig von der Art der Pflanzennahrung: dieselben finden sich im Harn von Thieren nach Fütterung mit Rüben oder Kartoffeln nur in sehr geringer Menge. Die Hippursäureausscheidung ist in diesem Falle auch unbedeutend, und man konnte daran denken, dass das Auftreten der aromatischen Aetherschwefelsäuren im Harn in einer Beziehung stünde zur Ausscheidung der Hippursäure; diess scheint aber nicht der Fall zu sein: ich beobachtete öfters, dass die ersteren sehr reichlich vorkommen im Pferdeharn, der so arm an Hippursäure war, dass er zum Syrup ver-

<sup>(1)</sup> Pflüger's Arch. XIII. p. 285.

<sup>(2)</sup> Ber. d. chem. Ges. IX, p. 1389.

dunstet, mit concentrirter Salzsäure versetzt, keine Hippursäurekrystalle gab. Der Harn einer Ziege, die 8 Tage nur mit Hafer gefüttert worden war, war reich an gepaarten Schwefelsäuren; das Destillat des mit Salzsäure versetzten Harns gab mit Bromwasser einen fast augenblicklich krystallisirenden Niederschlag, ähnlich wässerigen Phenollösungen. Nach Fütterung mit Wiesenheu waren gepaarte Schwefelsäuren gleichfalls reichlich im Harn; das Destillat des angesäuerten Harns gab mit Bromwasser eine starke Trübung, die aber nicht krystallinisch wurde, sondern als eine braungelbe schmierige Masse sich nach einiger Zeit absetzte. Im letzterem Falle enthielt also das Destillat nur wenig; vielleicht überhaupt kein Phenol ( $C_6H_6O$ ), sondern homologe desselben.

Hinsichtlich der Art der Entstehung der Aetherschwefelsäuren im Thierkörper aus Pflanzensubstanz war die Vorstellung naheliegend, dass durch die Fäulnisprocesse im Darm aus derselben Phenole oder aromatische Kohlenwasserstoffe gebildet und resorbirt würden, die sich dann weiter mit Schwefelsäure vereinigten, wie in den Thierkörper eingeführtes Phenol oder Benzol. Versuche, die eine Abspaltung solcher aromatischer Verbindungen an Futtermitteln (Heu, Gras, Hafer) durch die Fäulnis ausserhalb des Thierkörpers bezwecken sollten, führten indess zu keinem Resultat.

Die Pflanzennahrung ist aber, wenn auch weitaus die reichlichste, doch nicht die einzige Quelle der Phenolverbindungen des Thierkörpers; dieselben finden sich in geringer Menge häufig auch im Harn von Thieren, die nur mit Fleisch gefüttert worden sind: <sup>(1)</sup> Salkowski <sup>(2)</sup> hat auch einige Fälle mitgetheilt, wo in Folge von Krankheiten im menschlichen Harn Phenolverbindungen in sehr reichlicher Menge neben grossen Mengen Indican enthalten waren, deren Vorkommen nicht durch Pflanzennahrung bedingt zu sein schien.

Bei der Prüfung des Harns auf Phenolverbindungen, namentlich wenn diese nur in geringer Menge zugegen sind,

<sup>(1)</sup> Pflüger's Arch. XII, p. 67.

<sup>(2)</sup> Ber. d. chem. Ges. IX, p. 1595.

kann man den Harn nie direkt mit Bromwasser versetzen, sondern der Harn muss zu dem Zwecke stets mit einer Mineralsäure erst destillirt werden. Das in jedem Harn enthaltene Indican gibt, wie das Indol selbst, mit Bromwasser eine Trübung, die allerdings nie krystallinisch wird, sondern aus nicht zu verdünnten Lösungen als braunflockiger Niederschlag sich absetzt. Es ist ferner im Hundeharn fast immer eine Substanz enthalten, die Kynurensäure, welche einen in Wasser ganz unlöslichen Niederschlag mit Bromwasser gibt, der leicht mit einer Phenolreaktion verwechselt werden könnte. Reine Lösungen von Kynurensäure geben auf Zusatz von Bromwasser einen starken citrongelben Niederschlag, der bald krystallinisch wird; in Alkohol ist derselbe schwer löslich und kann durch Umkrystallisiren aus kochendem Alkohol gereinigt werden. In Hundeharn, der, frei von Phenolverbindungen, längere Zeit zur Abscheidung der Kynurensäure mit Salzsäure gestanden hatte, somit auch kein Indican mehr enthielt, wurde nach dem Abfiltriren mit Bromwasser noch ein nicht unbeträchtlicher Niederschlag erhalten, der aus der Bromverbindung der Kynurensäure bestand. Das Bromwasser kann somit auch zum Nachweis von Kynurensäure benutzt werden, falls man gewisse Vorsichtsmassregeln beobachtet und namentlich lässt sich durch dieselbe leicht constatiren, dass durch Ansäuern von Hundeharn mit Salzsäure immer nur ein grösserer Theil der darin enthaltenen Kynurensäure sich gewinnen lässt. Die Bromverbindung selbst soll Gegenstand weiterer Untersuchung sein.

Da die nach reiner Fleischfütterung im Hundeharn gefundenen Phenolverbindungen im Thierkörper nur aus Eiweiss entstanden sein konnten, schien es mir wichtig die Bedingungen zu ermitteln, unter welchen Phenol aus Eiweiss entstehen könnte. Hoppe-Seyler hat in der jüngsten Zeit darauf hingewiesen, dass die Zersetzungsprodukte der Substanzen im Thierkörper ähnlich und in manchen Fällen identisch sind mit den Produkten von Fäulnisprozessen, welche ausserhalb des Thierkörpers verlaufen. In Rücksicht darauf untersuchte ich die Produkte der durch Pancreas-

ferment eingeleiteten Fäulniss von Eiweiss auf Phenol und es zeigte sich in der That, dass das letztere bei der Fäulniss von Eiweiss ganz constant auftritt.

Lässt man Mischungen von Eiweiss und Pankreas mit Wasser, wie sie Nencki für die Darstellung von Indol benutzt hat, bei  $40^{\circ}$  stehen, so findet sich nach 6 Tagen neben reichlichen Mengen von Indol immer eine Substanz in der gefaulten Masse, die alle Reaktionen des Phenols zeigt. Indol tritt bei der Fäulniss von Eiweiss mit Pankreas gewöhnlich am 2. Tage auf; alsdann ist Phenol noch nicht nachweisbar. Am reichlichsten wurde das Phenol stets aus Flüssigkeiten erhalten, die auch sehr viel Indol enthielten. Die Bildung beider Substanzen scheint befördert zu werden, wenn man dem Fäulnissgemenge auf 1 Liter Flüssigkeit 3—4 cem Ammoniumcarbonatlösung zusetzt. Hinsichtlich des Auftretens beider aromatischer Substanzen ergibt sich auch noch eine weitere Analogie, die bemerkenswerth ist: nach Versuchen, welche Herr Szabo im Laboratorium von Herrn Prof. Hoppe-Seyler anstellte, bildet sich weder Phenol noch Indol bei der Zersetzung der Eiweisskörper durch Erhitzen mit starken Mineralsäuren.

Für die Darstellung und den Nachweis von Phenol neben Indol erwies sich folgendes Verfahren zweckmässig: Die nach 6 Tagen aus dem Brütöfen entnommenen Flüssigkeiten werden destillirt, so lange das Destillat mit Bromwasser noch deutlich getrübt wird; das stark alkalische Destillat wird mit  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Volumen Aether gut geschüttelt, die ätherische Lösung wird mit dem Scheidetrichter abgehoben, abdestillirt, mit Aetzkali und Wasser versetzt und wieder destillirt; es geht jetzt mit dem Wasser neben Ammoniak nur Indol über, das im Anfange der Destillation den Kühler leicht verstopft, wesshalb man die Kühlung entsprechend zu reguliren hat. Das so erhaltene Indol ist völlig rein und bleibt auch nach längerer Zeit schön weiss, was nicht der Fall war bei Präparaten, die früher nach den Angaben von Nencki<sup>(1)</sup>

(<sup>1</sup>) Ber. d. chem. Ges. VIII, p. 336.

dargestellt und einmal aus Wasser umkrystallisirt waren; letztere haben sich nach einiger Zeit gelb bis braun gefärbt und erwiesen sich als phenolhaltig.

Wenn bei der Destillation kein Indol mehr übergeht, wird der Rückstand in der Retorte mit Schwefelsäure möglichst genau neutralisirt und wieder destillirt; die jetzt übergehende Flüssigkeit gibt mit Bromwasser stets reichliche Niederschläge, die sehr bald sich in feine Krystallnadeln verwandeln, ganz so wie man dies bei verdünnten Phenollösungen beobachtet. Das Destillat gibt mit Eisenchlorid direkt meist keine deutliche Reaction; schüttelt man dasselbe aber mit Aether und verdunstet die ätherische Lösung, so erhält man (aus mehreren Rindspankreas) einige ölige Tropfen, die einen deutlichen Phenolgeruch und auf die Haut gebracht ätzende Eigenschaften zeigen; in Wasser gelöst geben sie mit Eisenchlorid eine blau-violette Färbung, mit Ammoniak und einem Körnchen Chlorkalk eine schön blaue Reaction. Das so erhaltene Phenol ist aber noch nicht rein und das durch Fällen mit Bromwasser daraus gewonnene Tribromphenol gab bei der Analyse um ein bis mehrere Procent zu viel Brom; diese Produkte schmelzen zwischen 70 und 80°; zur Reinigung werden dieselben in verdünnter Kalilauge gelöst, von dem ungelösten braunen Rückstande abfiltrirt und mit Salzsäure gefällt; ein so gereinigtes Präparat zeigte den Schmelzpunkt von Tribromphenol. Der höhere Bromgehalt im ursprünglichen Bromprodukte ist wahrscheinlich bedingt durch Beimengung eines anderen bromreichen Körpers, vielleicht Bromoform.

Die Menge von Phenol, welche auf diese Weise aus Eiweiss erhalten werden, sind gering, aber keineswegs zu übersehen; in einem Falle wurden aus 100 Gramm frischem Pankreas mit 100 Gramm nassem Fibrin in 250 ccm. Wasser nach 6tägiger Fäulniss 0,078 Gramm Tribromphenol gewonnen — 0,022 Gramm Phenol.

An und für sich ist die Thatsache überraschend, dass diejenige Substanz, die wir als am stärksten fäulnisswidrig betrachten, durch die Fäulniss selbst gebildet wird. Das späte Auftreten des Phenols bei der Fäulniss spricht bestimmt

dafür, dass dasselbe nicht direkt aus dem Eiweiss abgespalten wird, sondern ein secundäres oder weiteres Spaltungsprodukt desselben ist. Es schien sogar naheliegend anzunehmen, dass dasselbe aus einer weiteren Zersetzung des Tyrosins hervorgehen könnte, die in ähnlichem Sinne verlief, wie die Spaltung desselben mit Kalihydrat. Es zeigte sich aber, dass Pankreas mit Tyrosin bis 14 Tage und länger bei 40° erwärmt, nicht reichlicher Phenol bildet, als für sich allein. Pankreasinfuse, denen 1% Tyrosin zugesetzt war, bewirkten die Eiweissfäulniss viel langsamer, als solche ohne Tyrosin.

Es schien mir von Interesse noch das Verhalten einer anderen aromatischen Substanz bei der Fäulniss zu untersuchen, deren Vorkommen im Thierkörper zwar nicht erwiesen ist, die aber in ganz naher Beziehung zum Tyrosin steht, der Paraoxybenzoësäure. Diese verhält sich ganz anders als das Tyrosin, sie wird, wenn man sie mit Pankreas in verdünnter Lösung einige Tage bei 40° erwärmt, in Phenol und Kohlensäure gespalten. ½ Gramm reine Paraoxybenzoësäure wurde mit 50 Gramm Pankreas, 200 ccm. Wasser und einigen Tropfen Ammoniumcarbonatlösung 4 Tage lang bei 40° erwärmt; hierauf wurde mit Aether geschüttelt, der aus der ammoniumkalischen Lösung keine Paraoxybenzoësäure wohl aber das Phenol aufnimmt. Der nach dem Verdunsten der ätherischen Lösung in Wasser aufgenommene Rückstand gab mit Eisenchlorid eine tief blaue Färbung, ebenso die übrigen Reaktionen des Phenols. Selbstverständlich war die angewandte Paraoxybenzoësäure frei von Phenol.

Aus den mitgetheilten Versuchen ergibt sich eine einfache Erklärung für das Auftreten von Phenolverbindungen im Harn nach Fleischnahrung; dieselben sind in diesem Falle, wie das Indican aus Zersetzungsprodukten von Eiweiss selbst gebildet; sie sind aber keine so constanten Bestandtheile des Harns unter den angegebenen Verhältnissen wie das Indican, dessen Bildung im Thierkörper aus Indol Jaffé<sup>(1)</sup> nachgewiesen hat.

(1) Centralbl. med. Wissensch. 1872. p. 2.

Die Zusammensetzung des Indicans, namentlich die Constitution des mit Schwefelsäure verbundenen Paarlings der Indolgruppe ist weniger genau gekannt als die früher genannten Verbindungen. Nach einer Angabe von Schunk hatte man dasselbe früher für ein Glusorid gehalten; ich habe indessen nachgewiesen, dass bei der Spaltung desselben durch verdünnte Säuren kein Zucker gebildet wird, <sup>(1)</sup> dagegen Schwefelsäure und eine noch nicht genau untersuchte Verbindung, welche der Indigogruppe angehört und die schon früher Nencki <sup>(2)</sup> als ein Zersetzungsprodukt des Indicans gefunden hat.

Der Reindarstellung des Indicans stellen sich besondere Schwierigkeiten entgegen, da die allein Beständigen Verbindungen desselben mit Alkalien sehr leicht löslich und schwer krystallisirbar sind. Indessen wird man durch eine quantitative Verfolgung der Zersetzungsprodukte des Indicans zu einer genaueren Vorstellung über die chemische Zusammensetzung desselben gelangen können. Der direkte Beweis, dass das Indican des Harns eine gepaarte Schwefelsäure, schien mir dadurch geführt, dass nach Indoleingabe Indican und gepaarte Schwefelsäure gleichzeitig erheblich vermehrt waren. Diese Beweisführung war natürlich anfechtbar, wenn dem Indol Phenol oder ähnliche Substanzen auch nur in geringer Menge beigemischt waren; an die Möglichkeit einer solchen Verunreinigung hatte ich bei der Anstellung der genannten Versuche <sup>(3)</sup> nicht gedacht; ich hielt es deshalb für geboten, diesselben mit ganz reinem Indol zu wiederholen, zumal Salkowski <sup>(4)</sup> nach Indoleinspritzungen auch eine Vermehrung des Phenolgehaltes des Harns beobachtet hat, so dass es sogar scheinen könnte, dass das Indol im Thierkörper nicht blos in Indican, sondern auch in Phenol überginge.

<sup>(1)</sup> Pflüger's Arch. XIII. p. 307.

<sup>(2)</sup> Ber. d. chem. Ges. IX. p. 300.

<sup>(3)</sup> Pflüger's Arch. XIII. p. 307.

<sup>(4)</sup> Ber. d. chem. Ges. IX. p. 1595.

Zu dem Versuche diente ein Hund, der längere Zeit mit Fleisch gefüttert worden war; in 100 ccm. Harn desselben war nach Destillation mit Salzsäure Phenol nicht nachweisbar. Derselbe erhielt an einem Tage 0,9 Gramm reines Indol in verschiedenen Portionen mit dem Futter; am folgenden Tage entleerte das Thier den ersten Harn, der an Indican sehr reich und von Phenolverbindungen so frei wie vor dem Versuche war. Die Ausscheidung des Indicanharns dauerte über 2 Tage; erst am 3. Tage kehrte der Harn zu der Zusammensetzung zurück, die er vor dem Versuche hatte. Dem Anwachsen und der Abnahme des Indicans gehen parallel die Veränderungen in der Ausscheidung der gepaarten Schwefelsäure und dadurch ist mit voller Sicherheit der Nachweis geliefert, dass das Indican des Harns eine gepaarte Schwefelsäure ist.

	Harn- menge in Gc.	Spec. Gew.	Schwefels.( <sup>1</sup> )		Phenol- bindungen	Indican.
			a)	b)		
1. Tag normaler Harn Das Thier erhält 0,9 Gr. Indol.	355	1,031	1,270	0,034	fehlt.	schwache Reaktion.
2. Tag	277	1,028	0,538	0,245	—	grosse Mengen.
3. Tag	382	1,028	0,699	0,359	—	—
4. Tag	403	1,030	1,457	0,054	—	ungefähr wie am 1. Tage.

Bei der Verarbeitung des sehr indicanreichen Harns machte ich noch eine Beobachtung, die von neuem zeigt, dass eine grosse Analogie des Verhaltens von Indol und Phenol im Thierkörper besteht. Beim Stehen des Harns nach wenigen Stunden ebenso bei den Schwefelsäurebestimmungen wurden stets kleine Mengen Indigo aus demselben abgeschieden; gleichwohl habe ich früher nachgewiesen, dass

(<sup>1</sup>) a) bedeutet die in Form von Sulfaten im Harn enthaltene Schwefelsäure. b) die in gepaarten Verbindungen ausgeschiedene Schwefelsäure.



das Indican weder beim Erwärmen des Harns mit verdünnter Essigsäure noch bei der alkalischen Harngährung (innerhalb einiger Tage) zersetzt wird. In der That gelang es nachzuweisen, dass das Indol im Thierkörper nicht bloss in Indican, welches ich als gepaarte Schwefelsäure beschrieben habe, übergeht, sondern daneben noch eine zweite Indigo bildende Substanz in geringerer Menge liefert, welche bei ihrer Zersetzung neben Indigo keine Schwefelsäure abspaltet. Dieses Verhalten ist ganz analog dem des Phenols, <sup>(1)</sup> von welchem ich früher gezeigt habe, dass es im Thierkörper zum Theil in Phenylschwefelsäure übergeht, zum Theil aber in eine andere Substanz, welche beim Erwärmen mit Salzsäure Phenol, aber keine Schwefelsäure liefert.

Der indicanreiche Harn wurde eingedampft, mit absolutem Alkohol aufgenommen, mit alkoholischer Oxalsäurelösung und 1 Volumen Aether versetzt; das Filtrat wurde sofort mit kohlensaurem Kali neutralisirt, verdunstet und wieder mit Alkohol aufgenommen. Der gelb gefärbte Rückstand der alkoholischen Lösung wurde in etwa 100 cem. Wasser gelöst: Diese schwach alkalisch reagirende Flüssigkeit blieb einige Zeit an der Luft stehen, nach acht Tagen begann eine Abscheidung von Indigo in derselben und nach einigen weiteren Tagen hatte sich ein reichlicher Niederschlag von Indigo abgesetzt. Ein Theil des Filtrats, das immer noch schwach alkalisch reagirte, blieb bei weiterem Stehen an der Luft wochenlang vollkommen klar und enthielt noch grosse Mengen von Indican; dasselbe enthielt keine schwefelsauren Salze; die spontan sich zersetzende Indigo bildende Substanz ist also keine gepaarte Schwefelsäure. Der andere Theil des Filtrats gab mit Salzsäure und einigen Tropfen unterchlorigsauren Natrons eine reichliche Abscheidung von Indigo, und die davon abfiltrirte Flüssigkeit gab mit Chlorbarium einen starken Niederschlag von schwefelsauren Baryt: Es kann danach nicht zweifelhaft sein, dass nach Eingabe von Indol

(<sup>1</sup>) Pflüger's Arch. XIII. p. 299.

zwei verschiedene Indigo bildende Substanzen im Harn auftreten, von welchen die eine noch viel leichter zersetzlich ist, als die, welche ich als gepaarte Schwefelsäure nachgewiesen habe. Ich unterlasse es noch diesen Substanzen besondere Namen beizulegen, da zu erwarten ist, dass wir wenigstens über die Zusammensetzung der letzteren bald Genaueres erfahren werden.

Das spontan sich zersetzende Indican scheint hin und wieder auch im menschlichen Harn vorzukommen, welcher dann frisch oder nach ganz kurzer Zeit freiwillig Indigo abscheidet. Ich erhielt kürzlich einen solchen Harn, der alkalisch war und nach einigen Stunden Indigo absetzte; der nach zwei Tagen abfiltrirte Harn setzte spontan keinen weiteren Indigo mehr ab, gab aber mit Salzsäure und 1 Tropfen Chlorkalklösung noch eine sehr deutliche Indicanreaktion.

Nachschrift. Die Abhandlungen der Herren Salkowski,<sup>(1)</sup> Brieger<sup>(2)</sup> und Nenki<sup>(3)</sup>, welche erschienen sind, nachdem die vorstehende Arbeit der Redaktion übergeben war (April d. J.), konnten in derselben leider nicht mehr berücksichtigt werden. Die Angabe von Nenki<sup>(4)</sup>, dass das Indol durch Umkrystallisiren vollkommen rein erhalten werden kann, bezweifle ich durchaus nicht; — die von mir als phenolhaltig bezeichneten Präparate von Indol waren nur ein Mal aus Wasser krystallisirt; indessen hat die Reinigung des Indols durch Destillation mit Aetzkali den Vortheil, dass sie keinen Verlust bedingt.

(<sup>1</sup>) Ber. d. d. chem. Ges. X, S. 842.

(<sup>2</sup>) Ber. d. d. chem. Ges. X, S. 1027.

(<sup>3</sup>) Ber. d. d. chem. Ges. X, S. 1032.

(<sup>4</sup>) Ber. d. d. chem. Ges. X, S. 1034.