

Weitere Beiträge zur Kenntniss der Harnstoffbildung.
Das Verhalten der Amidobenzoësäure im Thierkörper.

Von

Prof. E. Salkowski.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Institutes zu Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 24. Oktober 1882.)

Durch Analogieen geführt, habe ich schon vor längerer Zeit Versuche darüber angestellt, ob Amidobenzoësäure im Körper in Uramidobenzoësäure übergeht. Im bejahenden Falle gedachte ich diese Reaction für die Untersuchung des Vorganges der Uramidosäurebildung im Thierkörper überhaupt zu verwerthen, für welchen Zweck die Uramidosäurebildung aus Taurin zu beschränkt ist. Meine Voraussetzung, dass die Amidobenzoësäure eine Uramidosäure bilden werde, stand freilich im Widerspruch mit einer früheren Angabe von Schultzen und Græbe¹⁾, nach welcher auch die Amidobenzoësäure, analog den anderen substituirten Benzoësäuren eine Hippursäure, also Amidohippursäure bilden soll; allein einerseits lauteten die Angaben dieser Autoren ziemlich unbestimmt, andererseits war die Uramidobenzoësäure zur Zeit der Versuche von Schultzen und Græbe eben erst entdeckt und es lag wohl die Möglichkeit vor, dass sie selbst so hervorragenden Forschern entgangen sein konnte.

Es kam bei meinen Versuchen ausschliesslich Metaamidobenzoësäure zur Anwendung, frei von Ortho- und Para-

¹⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 142, S. 354.

säure. Dieselbe war aus der auf bekanntem Wege dargestellten Metanitrobenzoësäure durch Reduction mit Zinn und Salzsäure erhalten. Ein grosser Theil des damals noch nicht käuflichen Präparates ist von meinem Bruder dargestellt, dem ich für die freundliche Ueberlassung zu bestem Dank verpflichtet bin.

Die Säure wurde meistens als Natriumsalz verwendet. Hunde erhielten auch mehrfach ein Gemisch von freier Säure und Natriumsalz. Kaninchen wurde in der Regel 1,5 bis 2 gr. an Natron gebunden in den Magen eingeführt. Hunde erhielten 2 bis im Maximum 10 gr. pro Tag; nach so grossen Mengen trat häufig Erbrechen ein, 5 gr. wurden jedoch gut vertragen. Ich selbst nahm wiederholt 5 gr. als Natriumsalz ein, leichte Brechneigung und Uebelkeit trat ziemlich regelmässig dabei auf.

Die Aufsuchung der Uramidobenzoësäure geschah in der Regel auf folgendem Wege: Der Harn wurde im Wasserbade verdampft, mit Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug eingedampft, in Wasser gelöst, mit Salzsäure oder Schwefelsäure stark angesäuert, und wiederholt mit grossen Mengen Aether ausgeschüttelt. Aus dem beim Abdestilliren des Aethers bleibenden, dünn-syrupösen Rückstand schieden sich nach 1--2 Tagen bräunlich gefärbte krümlige Massen ab, die durch Absaugen und Abpressen von der anhängenden Mutterlauge befreit wurden. (Lässt man zu lange stehen, so krystallisirt nebenher Hippursäure aus, deren Trennung dann Schwierigkeiten macht.) Mitunter wurde auch die beim Abdestilliren des Aethers bleibende rückständige Flüssigkeit in Wasser gegossen, das Gemisch zur Verjagung des rückständigen Aethers auf dem Wasserbade erhitzt, dann heiss filtrirt: aus der heissen wässerigen Lösung schieden sich dann allmählich bräunliche Körnchen aus. Man kann auch den eingedampften alkoholischen Auszug des Harns mit Essigsäure ansäuern und mit Aether schütteln. Das beim Verdunsten des Aethers bleibende Gemisch von Uramidobenzoësäure und Amidobenzoësäure, resp. Amidhippursäure ist durch Behandlung mit salzsäurehaltigem Wasser, in dem sich

die Amidobenzoësäure und Amidohippursäure gut lösen, leicht zu trennen. In jedem Falle wurde die Roh-Säure durch Waschen mit salzsäurehaltigem Wasser und wiederholtes Umkrystallisiren unter Anwendung von Thierkohle gereinigt. Oefters wurde auch die rohe Säure mit Kalkmilch erwärmt, der Ueberschuss von Kalk durch Einleiten von Kohlensäure entfernt, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert und mit Aether geschüttelt etc. Man erhält schliesslich die Säure in Form eines gelblich-weissen, schuppig-krystallinischen Pulvers, genau von dem Habitus der aus Amidobenzoësäure und Kaliumcyanat nach Menschutkin¹⁾ dargestellten Säure. Sie schmolz beim Erhitzen bis auf 220° nicht; das Bleisalz ging beim Erhitzen unter Wasser in eine weiche, amorphe, unlösliche Masse über. Beim Erhitzen mit alkalischer Chlorbaryumlösung im zugeschmolzenen Rohr bei 220° spaltete sie Kohlensäure ab.

0,1770 gr. wasserfreie Säure (bei 115° getr.) gab 0,1775 gr. BaCO₃ und 0,0435 gr. BaSO₄. Daraus berechnet sich abgespaltene CO-Gruppe 8,68%. Die Uramidobenzoësäure enthält 7,77%.

Trotzdem unzweifelhaft Uramidobenzoësäure vorlag und die Säure dem Aeussern nach rein erschien, ergaben die Analysen vielfach etwas abweichende Zahlen, nämlich 1 bis 2% zu viel C und zu wenig N. Es ist mir nicht gelungen, die Ursache hiervon für alle Fälle aufzufinden: wiederholt wurde constatirt, dass die Säure schwefelhaltig war; da anfangs, ehe dieses bekannt war, Kupferoxyd zur Verbrennung benutzt wurde, so konnte das fehlerhafte Plus an C wohl hierauf zurückgeführt werden, aber der Schwefelgehalt war oft minimal und die Verbrennung mit chromsaurem Blei gab auch etwas zu hohe Resultate. Weiterhin konnte man an die bei Uramidosäuren so häufige Anhydridbildung denken. Diese würde wenigstens den höheren Kohlenstoffgehalt erklären. Einigemale wurden Zahlen erhalten, welche für eine Verbindung gleicher Moleküle Amido- und Uramidobenzoësäure sprachen.

¹⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 153, S. 83.

So gab 0,2165 gr. eines Präparates aus Kaninchenharn 0,0991 H₂O und 0,4600 CO₂ = 5,08% H und 57,4% C.

Eine Verbindung gleicher Moleküle würde enthalten 4,75% H und 56,4% C¹⁾.

Ich führe zunächst die Analysen an:

A. Säure aus Hundeharn.

1) 0,2621 gr. wasserfrei gab 0,124 H₂O und 0,5195 CO₂ = 5,2% H und 54,06% C.

2) 0,237 gr. gab bei der N-Bestimmung nach Dumas 31,0 ccm. N. T = 20,3; B = 768,5 mm. Daraus berechnet sich 15,11% N²⁾.

3) 1,131 gr. der lufttrockenen Säure verlor über Schwefelsäure 0,008 gr., dann bei 6 stündigem Erhitzen bei 120° noch 0,098 gr., im Ganzen 0,106 gr. Daraus berechnet sich Krystallwasser:

a) für lufttrockne Substanz 9,28%.

b) für über Schwefelsäure getrocknete 8,72%.

Die Formel C₈H₈N₂O₃ + H₂O erfordert 9,09%. Die Säure hatte also über Schwefelsäure schon etwas Krystallwasser abgegeben. Dasselbe Verhalten giebt Menschutkin für die künstlich dargestellte Säure an und ich habe mich gleichfalls von der Richtigkeit seiner Angabe überzeugt.

¹⁾ Inzwischen hat J. Traube gefunden (Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XV, S. 2122), dass sich beim Erhitzen gleicher Moleküle Amido- und Uramidobenzoësäure unter Austritt von 1 Molekül NH₃ Harnstoffdibenzoësäure C₁₄H₁₂N₂O₆ bildet, welche 60,0% C und 9,33% N enthält. Es ist sehr möglich, dass sich diese Säure auch im Organismus bildet und der Uramidobenzoësäure beimischt. Dafür würde auch sprechen, dass sich beim Umkrystallisiren der erhaltenen Uramidobenzoësäure aus Wasser oft ein Antheil hartnäckig nicht löst.

²⁾ Menschutkin hat den Stickstoff durch Glühen mit Natronkalk bestimmt, ich bekam dabei zu niedrige Werthe; so gaben 0,2058 gr. künstlich dargestellte Uramidobenzoësäure nur 13,2% N (durch Titiren mit Silberlösung bestimmt). Menschutkin erhielt höhere, nahezu stimmende Werthe, allein er hat die Stickstoffbestimmung mittelst Platinchlorid ausgeführt und das gebildete Platindoppelsalz direkt gewogen, was nicht zulässig ist, da sich beim Glühen ausser Ammoniak auch Anilin bildet.

B. Säure aus Kaninchenharn.

- 1) 1,0037 gr. verlor bei 110° 0,0918 H₂O = 9,15%.
- 2) 0,1938 gr. gab 0,3862 CO₂ und 0,0814 H₂O = 54,35% C und 4,67% H.
- 3) 0,2795 gr. lufttrocken (Präparat anderer Darstellung) verlor bei 110°: 0,0255 H₂O = 9,12%.
- 4) 0,404 gr. Calciumsalz, wasserfrei, hinterliess beim Glühen 0,058 Aetzkalk = 10,25% Calcium.
- 5) 0,365 gr. Silbersalz, durch Fällung des Ammoniumsalzes mit Silbernitrat, Waschen und Abpressen erhalten, über Schwefelsäure getrocknet, gab 0,1394 metallisches Silber = 38,22%.

Zusammenstellung der Resultate.

a) Krystallwassergehalt der Säure.

Gefunden:		Berechnet:
9,28	9,15 9,12	9,09

b) C, H und N-Gehalt der Säure.

	Gefunden:		Berechnet:
C	54,06	54,35	53,33
H	5,2	4,67	4,44
N	15,11	—	15,55

c) Calciumsalz, Gehalt an Ca.

Gefunden:	Berechnet:
10,25	10,08

d) Silbersalz, Gehalt an Ag.

Gefunden:	Berechnet:
38,22	37,63

Beim Erhitzen mit Natronkalk lieferte die aus dem Harn dargestellte Säure Ammoniak und Anilin. Einigermassen charakteristisch ist auch das Verhalten der Säure beim Erhitzen im trockenen Reagensglas: sie schmilzt unter Bräunung und gibt ein anfangs öliges, sehr bald zu einer gelblich-weissen krystallinischen Masse erstarrendes Sublimat. Genau ebenso verhält sich die nach Menschutkin dargestellte Säure.

Für den Menschenharn glaubte ich mich auf die Constatirung der Eigenschaften der erhaltenen Säure beschränken zu können, welche keinen Zweifel an der Natur derselben liessen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass sich sowohl beim Fleischfresser, als auch beim Pflanzenfresser und ebenso auch beim Menschen aus eingeführter Amidobenzoësäure eine gewisse Menge Uramidobenzoësäure bildet: sie liefern also ein neues Beispiel für die Addition der Cyansäure im Körper zu den bereits bekannten, wenn man daran festhalten will, dass unter den Bedingungen wie sie im Thierkörper herrschen, bisher kein anderer Bildungsmodus der Uramidosäuren, als die Addition von Cyansäure bekannt ist. Für den Pflanzenfresser ist dieses Factum nicht ohne Werth. Bereits in Band I dieser Zeitschrift, S. 31 hatte ich auf die Bildung der Uramidobenzoësäure beim Kaninchen hingewiesen. Lange Zeit blieb diese Beobachtung die einzige über die Uramidosäurebildung beim Pflanzenfresser, bis kürzlich Blendermann¹⁾ die Anlagerung der Cyansäure an das Tyrosin im Körper des Kaninchens constatirte.

Die Ausbeute an Uramidobenzoësäure ist nun im Verhältniss zur eingeführten Amidobenzoësäure stets geringfügig. Beim Kaninchen habe ich etwa 5% als Uramidosäure wieder erhalten, beim Hund steigt die Menge nach Ausweis der quantitativen Bestimmungen nach Bunsen auf etwa 20%, doch habe ich so grosse Mengen nie aus dem Harn wirklich erhalten können. Ausserdem kommen bei Hunden individuelle Ausnahmen vor; bei manchen Hunden gelang es nur schwer, überhaupt den Nachweis zu führen, dass sich Uramidobenzoësäure gebildet hatte. Nach den Beobachtungen von Jaarsveld und Stokvis²⁾ und noch mehr nach denen Schmiedeberg's³⁾ über die Zerlegung der Hippursäure im Körper, konnte man wohl daran denken, dass sich zwar eine grössere Menge Uramidobenzoësäure bildet, aber nicht zur

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 234.

²⁾ Archiv für experimentelle Pathologie, Bd. X, S. 268.

³⁾ Ebendasselbst, Bd. XIV, S. 379.

Ausscheidung gelangt, sondern wieder zerlegt wird. Gegen diese Annahme spricht aber, dass sich auch kleine Mengen eingeführter Uramidobenzoësäure wiederfinden lassen. Man erhält dieselbe freilich bei Weitem nicht quantitativ wieder. So ergab die Verarbeitung des Harns eines Kaninchens nach Verabreichung von 0,150 gr. Uramidobenzoësäure als Natriumsalz nur 0,0306 gr. Säure, aber man erhält auch nur unerheblich mehr wieder, wenn man dieselbe Menge Uramidobenzoësäure zu der entsprechenden Harnmenge zusetzt und wieder darzustellen sucht. Es liegt also kein Grund vor, eine Zersetzung bereits gebildeter Uramidobenzoësäure anzunehmen, die Bildung derselben erfolgt vielmehr nur in beschränktem Umfang und der grösste Theil der Amidobenzoësäure wird unverändert ausgeschieden: dampft man die, Schwefelsäure oder Salzsäure enthaltende, wässrige Lösung, die vorher mit Aether geschüttelt ist, ein wenig ein, so erstarrt sie nach einiger Zeit zu einem Brei von schwefelsaurer, resp. salzsaurer Amidobenzoësäure, die durch Absaugen auf Thonplatten und Umkrystallisiren aus starken, heissem Alkohol etc. leicht von anhängenden Salzen und anderen Verunreinigung zu befreien ist. In einzelnen Fällen erwies die genauere Untersuchung dieser Krystallisation, dass sie nicht aus salzsaurer Amidobenzoësäure, sondern aus salzsaurer Amidohippursäure bestand. Zur Isolirung der Amidohippursäure aus der Verbindung kann man verschiedene Wege einschlagen. Am einfachsten löst man sie in Wasser und setzt vorsichtig Ag_2O oder Ag_2CO_3 zu unter Schütteln im Kolben, bis eine kleine Menge Silber in Lösung gegangen ist, filtrirt, entfernt den Silberüberschuss durch Schwefelwasserstoff, dampft das Filtrat ein: beim Erkalten krystallisirt die Amidohippursäure in feinen weissen Nadeln aus, die dann durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser, nöthigenfalls unter Anwendung von Thierkohle vollends zu reinigen sind. Man muss dabei mit dem Silberzusatz sehr vorsichtig sein: setzt man zu viel zu, so erstarrt die ganze Flüssigkeit plötzlich zu einem Krystallbrei von amidohippursaurem Silber, welches nunmehr von dem Chlorsilber nicht mehr zu trennen ist: versucht man

das Salz durch Erwärmen zu lösen, so tritt Reduktion und Zersetzung ein.

Die erhaltene Amidohippursäure schmolz bei 192° , also sehr nahe dem von Conrad¹⁾ angegebenen Schmelzpunkt (194°) beim Kochen mit Salzsäure im Kolben spaltete sie sich in Glycocoll und Amidobenzoësäure, die in folgender Weise nachgewiesen wurden. Die salzsaure Lösung wurde durch Eindampfen auf dem Wasserbade von überschüssiger Salzsäure befreit, die Lösung mit kleinen Mengen Ag_2CO_3 geschüttelt, filtrirt, der Ueberschuss vom Silber durch Schwefelwasserstoff entfernt und das Filtrat vom Schwefelsilber stark eingeengt: beim Stehen krystallisirte allmählig die Amidobenzoësäure in röthlich-weissen Körnchen aus. Das Filtrat von der Amidobenzoësäure wurde zur möglichst vollständigen Entfernung noch darin gelöster Säure völlig zur Trockene gedampft, mit wenig Wasser übergossen und von dem geringen Rückstand nochmals abfiltrirt, das Filtrat mit frisch gefälltem Kupferoxydhydrat gekocht, das mit tiefblauer Farbe in Lösung ging; das heisse Filtrat lieferte beim Erkalten eine reichliche krystallinische Ausscheidung von Glycocollkupfer. Die Krystallmasse wurde abgepresst, in Wasser gelöst und gab nach Ausfällung des Kupfers durch Schwefelwasserstoff völlig reines Glycocoll.

Es lag nun nahe, anzunehmen, dass sich in allen Fällen Amidohippursäure bilde, jedoch beim Eindampfen der salzsäurehaltigen Lösung zersetzt werde. Dies mag wohl vorkommen, constant ist indessen die Bildung der Amidohippursäure nicht. Um dieses nachzuweisen wurde der eingedampfte Harn mit Essigsäure angesäuert und mit Aether geschüttelt; der beim Verdunsten des Aethers bleibende Rückstand mit verdünnter Salzsäure behandelt, welche die Uramidobenzoësäure unlöslich zurückliess. Die salzsaure Lösung wurde mit Ag_2CO_3 behandelt etc., es resultirte nicht regelmässig Amidohippursäure, sondern oft auch Amidobenzoësäure und zwar auch bei Kaninchenharn. Die Amidohippursäure muss also entweder ausserordentlich leicht zersetzlich sein, oder sie

¹⁾ Beilstein's Handbuch der organischen Chemie, S. 1155.

bildet sich in der That nicht regelmässig. Da dieser Punkt nicht in dem Plan der Untersuchung lag, habe ich ihn nicht weiter verfolgt.

Eine Reihe von Versuchen habe ich ausgeführt, um zu einer näheren Kenntniss des Einflusses der Amidobenzoësäure auf den Eiweisszerfall zu gelangen.

Dieselben sind z. Th. älteren Datums.

Versuch I.

Kaninchen bei Weizenfütterung.

Der Harn von 3 Tagen (20., 21., 22./7 1874) auf 300 cc. 100 cc. geben mit BaCl_2 und HCl $0,157 \text{ BaSO}_4 = 0,471 \text{ gr.}$ in 3 Tagen.

Am 23., 24., 25. erhält das Thier je 2,5 gr. Amidobenzoësäure an Natron gebunden. Harn auf 300 cc. 100 cc. geben $0,310 \text{ BaSO}_4 = 0,930 \text{ gr.}$

Versuch II.

Kaninchen bei Kartoffelfütterung (160 gr. pro Tag).

Die aus dem Harn p. d. erhaltenen Mengen BaSO_4 waren:

Datum.	BaSO_4 p. d.	Bemerkungen.
12. und 13./10 1874	0,202	—
14. « 15. «	0,346	Am 14. 2,5 gr., ebenso am 15., Amidobenzoësäure als Na-Salz.
16. « 17. «	0,244	16. und 17. Wassereinspritzung.
18. « 19. «	0,208	18. und 19. do.
20. « 21. «	0,321	25. und 26. je 2 gr. Amidobenzoësäure als Natriumsalz.

Versuch III.

Kaninchen bei Kartoffelfütterung.

Harn am 23., 24., 25., 26./2 1875 auf 400 cc.

100 cc. geben $0,467 \text{ BaSO}_4$ direct und $0,069$ im Filtrat. N-Gehalt $0,3125\%$, also in 4 Tagen $1,250 \text{ gr.}$ (5 cc. brauchen bei der Bestimmung nach Seegen $6,25 \text{ cc.}$ Silberlösung, von der $1 \text{ cc.} = 0,0025 \text{ N.}$)

Am 27., 28./2, 1./3 und 2./3 erhält das Kaninchen p. d. $2,0 \text{ gr.}$ Amidobenzoësäure als Natronsalz. Der Harn auf 500 cc.

100 cc. geben 0,222 BaSO₄ direct und 0,104 im Filtrat. Der Stickstoffgehalt beträgt 0,5225% = 2,6125 gr. (5 cc. brauchen bei der N-Bestimmung im Rohr 10,7 resp. 10,2, im Mittel 10,45 cc. der Ag-Lösung).

Es ist also ausgeschieden:

	Schwefelsäure als BaSO ₄			Stickstoff
	a) direct	b) im Filtrat	c) Summa	
Normal	0,668	0,276	0,944	1,250
Bei Amidobenzoësäure- fütterung	1,110	0,520	1,630	2,6125

Die Differenz in der N-Ausscheidung zwischen beiden Perioden beträgt 1,3625 gr.; mit der Amidobenzoësäure sind zugeführt 0,817 gr., das Plus von 0,5455 gr. ist auf die Steigerung des Stoffwechsels zu beziehen.

Die Versuche an Kaninchen weisen also auf eine Steigerung des Stoffwechsels in Folge der Verabreichung der Amidobenzoësäure hin; ganz besonders charakteristisch ist in dieser Beziehung der Wechsel in der Höhe der Schwefelsäure- und Schwefelausscheidung an den Fütterungs- und Normaltagen. Unentschieden bleibt dabei, ob die Vermehrung des Eiweisszerfalles von der Bildung der Uramidosäure herührt oder ob auch Harnstoff in vermehrter Menge gebildet ist.

Das Verhältniss zwischen neutralem und oxydirten Schwefel betrug in Versuch III in der Normalperiode 1:2,4; in der Fütterungsperiode 1:2,1, Bildung schwefelhaltiger Substanzen lässt sich somit nicht sicher nachweisen.

Schliesslich überzeugte ich mich noch wiederholt, dass der bei Amidobenzoësäurefütterung entleerte Harn keine durch das Schlösing'sche Verfahren nachweisbare Menge Ammoniak enthielt, wie es nach meinen früheren Erfahrungen über das Fehlen des Ammoniaks im Pflanzenfresserharn auch nicht anders erwartet werden konnte.

Versuch IV.

Hund von ca. 5 kg Körpergewicht. Fütterung mit 70 gr. Brod und 200 gr. dünner Milch.

Am 5., 6., 7., 8./11 1874 erhielt der Hund je 2 gr. Amidobenzoësäure als Natriumsalz.

Die Ausscheidung der Schwefelsäure, ausgedrückt als BaSO_4 betrug:

a) Normaltage		b) nach Amidobenzoësäure	
Am 1. und 2. Tage zus.	1,023	Am 5. Tage . . .	0,7980
« 3. Tage	0,694	« 6.	0,7035
« 4.	0,617	« 7.	0,6785
4 Tage	2,334	8.	0,8418
		4 Tage	3,0218

Die Differenz zwischen der Ausscheidung der Normaltage und der Fütterungstage betrug 0,6878. Wenn auch zugegeben werden muss, dass die Versuche in ihrer Ausführung nicht den Ansprüchen gerecht werden, die man heutzutage an einen Stoffwechselversuch macht, so ist an der Steigerung des Eiweisszerfalles doch wohl nicht zu zweifeln. Die Ausscheidung des neutralen Schwefels, ausgedrückt als BaSO_4 betrug am 4. Tage 0,288 gr., an den Fütterungstagen im Mittel 0,345 gr., das Verhältniss zwischen neutralem und oxydirtem Schwefel also normal 1 : 2,14, an den Fütterungstagen 1 : 2,19. Daraus geht hervor, dass sich aus der Amidobenzoësäure im Körper keine schwefelhaltigen Substanzen bilden.

Auch die gepaarte Schwefelsäure Baumann's erfährt durch Zuführung von Amidobenzoësäure keine Anwendung, wie Versuch V. zeigt, den ich gelegentlich schon einmal angeführt habe¹⁾.

Versuch V.

Hund von ca. 25 kg Körpergewicht, bei Fütterung mit 500 gr. Fleisch und 50 gr. Speck pro Tag annähernd im N-Gleichgewicht.

Der Hund erhielt zuerst drei Tage hinter einander je 5 gr. Amidobenzoësäure als Natriumsalz, dann Paraoxybenzoësäure zur Demonstration dafür, dass die Bestimmung der Aetherschwefelsäure allein schon bindende Schlüsse zulässt. Die Aetherschwefelsäure ausgedrückt als BaSO_4 betrug:

2,12 1879	0,2106	} Normal.
3. «	0,2520	
4. «	0,2232	

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. 69, S. 554.

5./12 1879	0,2160	} 5 gr. Amidobenzoësäure als Na-Salz pro Tag.
6. "	0,1980	
7. "	0,2196	
8. "	0,2556	} 2,5 gr. Paraoxybenzoësäure als Na-Salz.
9. "	0,5220	
10. "	0,6444	} Je 4 gr. Paraoxybenzoësäure pro Tag.

Die Bestimmung der Aetherschwefelsäuren geschah nach dem von mir loc. cit. beschriebenen modificirten Baumannschen Verfahren.

Versuch VI.

Zu diesem Zweck diente ein Hund von etwa 20 kg. Körpergewicht, der längere Zeit bei sehr knapper Diät gehalten war. Während des Versuches und einige Tage vorher erhält er nur 150 gr. Brod und 100 gr. Speck. Die Amidobenzoësäure bekam er mit Wasser, im Futter eingerührt, pro Tag 10 gr., zur Hälfte neutralisirt. Regelmässig trat dabei Erbrechen ein: am 1. und 2. Fütterungstage wurde das Erbrochene vollständig wieder aufgefressen, am 3. dagegen nicht. Der Harn wurde durch Catheterisiren erhalten. Der Versuch war darauf gerichtet, den Umfang der Uramidosäurebildung mit Hülfe der Bunsen'schen Methode festzustellen und gleichzeitig zu ermitteln, wie sich die Harnstoffausscheidung dabei gestaltet, ob sie zunimmt, abnimmt oder unverändert bleibt. Zu dem Zweck musste also neben der Bunsen'schen Bestimmung noch die Liebig'sche ausgeführt werden. Im vorliegenden Falle ist es für diese erforderlich, die Amido- und Uramidobenzoësäure aus dem Harn vor dem Zusatz der Quecksilberlösung zu entfernen. Hierzu diente ein Verfahren, das ich schon im Bd. IV, S. 83 dieser Zeitschrift angegeben habe:

30 cc. Harn werden mit Kupfernitratlösung ausgefällt, die Mischung durch Wasserzusatz auf 60 cc. gebracht, durch ein trockenes Faltenfilter filtrirt. Von dem bläulich gefärbten Filtrat werden 30 cc., entsprechend 15 cc. Harn, mit 15 cc. Barytmischung versetzt und filtrirt. 15 cc. des Filtrats entsprechen 5 cc. Harn. Die Quecksilberlösung war eine empirisch gestellte: 1 cc. — 0,01 cc.

Harnstoff; es wurde nicht neutralisirt und der Harn bis nahe an die Grenze auf einmal zugesetzt, also «continuirlich titirt» im Sinne von Pflüger. (Die Correction wegen der Verdünnung nach Liebig).

Folgende Tabelle enthält die gefundenen Werthe:

Datum.	N nach Liebig.	CO nach Bunsen.	Differenz entspr. der Uramidosäure.	Bemerkungen.
2./6	3,34	—	—	
3.	3,50	3,749	0,249	Der 3., 4. und 5. sind Fütterungstage.
4.	4,196	4,389	0,141	
5.	3,826	4,238	0,126	
6.	4,435	4,611	0,176	
7.	3,827	—	—	
8.	3,484	—	—	

Aus diesen Zahlen geht hervor, dass die Harnstoffausscheidung unter dem Einfluss der Amidobenzoësäure steigt, ausserdem aber noch eine weitere Quantität Eiweiss zerfällt, welche die zur Bildung der Uramidobenzoësäure nöthige Menge Stickstoff liefert. Die Differenz zwischen dem Werth nach Liebig und nach Bunsen gibt gleichzeitig eine Anschauung über die Menge der gebildeten Uramidosäure. Im Ganzen beträgt das Plus an CO 0,692 gr. Die Menge der Uramidosäure würde sich daraus nach der Gleichung

$$28 : 180 = 0,692 : x$$

zu 4,444 gr. berechnen, im Verhältniss zu den eingegebenen 30 gr. (wovon freilich ein kleiner Theil nicht aufgenommen ist) eine ziemlich unbedeutende Quantität, Gegen die Stichhaltigkeit dieser Rechnung könnte nun eingewendet werden, dass an den Normaltagen keine Doppelbestimmungen nach Liebig und Bunsen ausgeführt sind, die Annahme, dass normaliter die Werthe nach Liebig und nach Bunsen gleich gross ausfallen, welche die Grundlage der Rechnung bildet, also nicht erwiesen ist. Ich habe desshalb noch einen zweiten Versuch an demselben Hunde gemacht.

Versuch VII.

Fütterung mit 150 gr. Brod. 50 gr. condensirter Milch, 50 gr. Speck.
300 cc. Wasser.

Am 25. erhielt der Hund 9,132 gr., am 26. 9,580 gr. Amidobenzoësäure, etwa zur Hälfte an Natron gebunden. Die Anordnung des Versuches ist dieselbe, wie in Versuch VI. An einigen Tagen ist noch der Stickstoff mit Natronkalk im Rohr bestimmt. Die erhaltenen Werthe sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Datum.	Gesamt-Stickstoff.	Stickstoff nach Liebig.	CO nach Bunsen.	Differenz zwischen Liebig'scher und Bunsen'scher Bestimmung.
21./6	4,010	3,872	—	—
22.	4,00	4,069	—	—
23.	4,044	3,998	3,917	— 0,081
24.	—	3,610	3,399	— 0,211
25.	4,635	4,127	4,347	+ 0,22
26.	5,168	4,386	4,717	+ 0,331
27.	—	3,682	3,849	+ 0,167
28.	—	2,970	2,766	— 0,213
29.	—	3,606	3,412	— 0,194

Vergleichen wir zunächst die Zahlen der Liebig'schen und Bunsen'schen Bestimmung, so ergeben sich an den Normaltagen (23., 24.; 28., 29.) die letzteren regelmässig niedriger, wie die ersteren, an den Fütterungstagen (25., 26. und 27., auf den sich noch der Einfluss der Amidobenzoësäure erstreckt) dagegen höher, entsprechend dem Gehalte an Uramidobenzoësäure. Die Differenz zwischen den Werthen beider Methoden an den Fütterungstagen ist im Ganzen 0,718 gr. Hieraus würde sich nach der Gleichung $28 : 180 = 0,718 : x$ 4,59 gr. Uramidosäure berechnen, resp. von der eingegebenen Amidobenzoësäure wären 3,51 gr. = 18,7% in Uramidobenzoësäure übergegangen. Diese Menge würde indessen nur das Minimum bezeichnen. Da an den Normaltagen die Werthe der Bunsen'schen Methode niedriger sind, wie die der Liebig'schen, und nicht gleich, wie obige

Rechnung voraussetzt, so ist die Menge der Uramidobenzoësäure, wie leicht ersichtlich, jedenfalls höher. Eine Berechnung damit anzustellen, erscheint indessen misslich, da die Differenzen an den Normaltagen ziemlich schwankend sind.

Die Zahlen für den Harnstoff sind an den Fütterungstagen höher, wie an den Normaltagen. Damit ist also die Frage, die ich mir in den «Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft», Bd. VIII, (1875), S. 118 vorlegte, ob die Bildung der Uramidosäuren im Körper auf Kosten des Harnstoffs erfolgt, oder auf Kosten von mehr zerfallendem Eiweiss, in letzterem Sinne entschieden: Die Harnstoffbildung wird durch die Bildung von Uramidosäure nicht berührt, sie verläuft ganz unabhängig davon.

Endlich sind noch einige Worte über die Zahlen der directen Stickstoffbestimmungen zu sagen. An den Normaltagen liegen sie denen für die Liebig'sche Bestimmung sehr nahe. Im Mittel der drei ersten Tage ist die Zahl für die directe Stickstoffbestimmung 4,018, für die Liebig'sche 3,980. Weit grösser ist die Differenz an den Fütterungstagen, an denen Amidosäure und Uramidosäure zur Ausscheidung gelangt. Auch den Werth der Bunsen'schen Bestimmung übertrifft die directe Bestimmung an den Fütterungstagen erheblich: die Differenz ist auf die Ausscheidung unveränderter Amidobenzoësäure zu beziehen.

Was den Ort der Bildung der Uramidobenzoësäure betrifft, so habe ich darüber einige Versuche an Kaninchen angestellt, denen die Nieren extirpirt, resp. die Ureteren unterbunden wurden. Nach der Extirpation der Nieren konnte im Blut, der Leber und den Muskeln, namentlich in den letzteren, nach dem Eingeben von Amidobenzoësäure Uramidobenzoësäure nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Organe darauf war ganz ähnlich der des Harns. Die Muskeln wurden mit Wasser von 40° möglichst erschöpft, die vereinigten Auszüge aufgeköcht, vom coagulirten Eiweiss abfiltrirt, eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen, der alkoholische Auszug verdunstet, dann mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt.

Aus dem beim Abdestilliren des Aethers bleibenden Rückstand schied sich Uramidobenzoësäure in krümliger Form aus, die dann wie oben angegeben gereinigt wurde. Die Leber wurde mit Sand verrieben und mit Wasser ausgekocht, das Blut durch Eingiessen in heisses Wasser coagulirt; im Uebrigen war die Behandlung die gewöhnliche. Immer war die aus den Organen gewonnene Menge Uramidobenzoësäure gering, so dass sie zu Analysen nicht ausreichte, trotzdem halte ich den Befund für vollkommen sicher. Nach Unterbindung der Ureteren fand sich keineswegs mehr Säure in den Organen, so dass man mit Bestimmtheit sagen kann, die Bildung der Uramidobenzoësäure erfolgt nicht in den Nieren. Nachdem inzwischen Schröder¹⁾ festgestellt hat, dass der Uebergang des kohlensauren Ammoniaks in Harnstoff in der Leber vor sich geht, ist die Frage, ob das Gleiche auch für die Bildung der Uramidosäure gilt, wohl discutirbar.

Wir haben somit bis jetzt vier Amidosäuren, an denen sich die ursprünglich von Schultzen angegebene Uramidosäurebildung nachweisen lässt: das Sarkosin, Taurin, Tyrosin und die Amidobenzoësäure, welche Substanzen theils als Uramidosäuren, theils als Anhydride im Harn erscheinen. Immer betrifft die Reaktion nur einen Theil der Substanz und das Verhalten der einzelnen Amidosäuren wird durch das verschiedene Verhalten des Restes ein äusserst wechselndes. Während die Amidobenzoësäure, soweit sie nicht Uramidosäure bildet, unverändert oder mit Glycocoll verbunden zur Ausscheidung gelangt und vermuthlich andere aromatische Amidosäuren sich gleich verhalten werden, zeigt das Tyrosin ein äusserst complicirtes Verhalten. Brieger²⁾ hat als Zersetzungsprodukt desselben Phenol, Blendermann³⁾ Oxyhydroparacumarsäure und Tyrosinhydantoin nachgewiesen, Schultzen und Nencki auch Harnstoff unter den Producten der Zersetzung angegeben und B. Küssner⁴⁾

¹⁾ Archiv für experimentelle Pathologie, Bd. XV, S. 364.

²⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. II, S. 256.

³⁾ Ebendasselbst, Bd. V, S. 234.

⁴⁾ Zur Lehre von den Vorstufen des Harnstoffs. Dissertation. Königsberg 1874.

diesen Befund bestätigt, es ist indessen nicht ausgeschlossen, dass die Vermehrung des Bariumcarbonat in diesem Falle von der Zersetzung des Tyrosinhydantoins herrührte; ausserdem wird ein Theil des Tyrosins unverändert ausgeschieden. Auch das Taurin hat, wie ich nachgewiesen habe, ein ziemlich complicirtes Verhalten: während beim Menschen und Hund ausser der Uramidosäure und unverändertem Taurin keine weiteren Produkte nachzuweisen sind, zerfällt das Taurin beim Kaninchen, in den Darmkanal eingeführt, unter Bildung von unterschwefliger Säure, Schwefelsäure und Harnstoff, während ein kleiner Theil den Körper unverändert passirt. Die Bildung von Uramidoisäthionsäure ist bei Kaninchen überhaupt noch nicht erwiesen.

Die Amidosäuren, die sich von den fetten Säuren der Reihe $C_n H_{2n} O_2$ ableiten, zerfallen, soweit wir bis jetzt wissen, entweder ganz oder doch zu einem erheblichen Theil unter Bildung von Harnstoff, nur ein Theil wird unverändert ausgeschieden (beim Sarkosin findet ausserdem Uramidosäurebildung statt).

Ich stimme in dieser Beziehung nicht mit Schiffer überein. Schiffer sagt¹⁾: «Unsere bisherigen Kenntnisse über das Schicksal des Sarkosins im Organismus würden sich also dahin zusammenfassen lassen: Die bei Weitem grösste Menge wird unverändert wieder ausgeschieden, ein geringer Theil, etwa $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{6}$, wird in die entsprechende Uramidosäure oder vielmehr deren Anhydrid umgewandelt und ein, wie es scheint, minimaler Bruchtheil wird zu Methylharnstoff oxydirt».

Diese Aeusserung steht in einem auffallenden Widerspruch mit dem Ergebniss meiner Versuche²⁾. Dieselben führten mich für Kaninchen zu dem Schluss, dass «der bei Weitem grösste Theil des Sarkosins in Form von Harnstoff ausgeschieden wird» (l. c., S. 124). Dieses Verhalten ist in der That so leicht zu constatiren, dass darüber gar kein Zweifel aufkommen kann. Man braucht nur den einge-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 266.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 56 und 100.

dampften Harn des Thieres mit Salpetersäure zu versetzen, um in der augenfälligsten Weise davon belehrt zu werden: der Harn der Normalperiode giebt dabei nur sehr wenig salpetersauren Harnstoff, der nach Sarkosinfütterung entleerte eine reichliche Krystallisation, während die Eiweisszersetzung nach Ausweis der Schwefelbestimmung nur unerheblich gesteigert ist. Und damit stehen auch die Bunsen'schen Harnstoffbestimmungen, welche die Menge der abgespaltenen CO-Gruppe angeben, in vollstem Einklang. Unverändertes Sarkosin konnte ich überhaupt nicht im Harn nachweisen. Der aus dem Sarkosin gebildete Harnstoff ist zum grössten Theil der gewöhnliche, nur ein sehr kleiner Theil kann als Methylharnstoff betrachtet werden.

Für den Hund gelangte ich zu einem ganz ähnlichen Resultate. Mein Schluss lautete (S. 119):

- 1) «Das Glycocoll geht zum grösseren Theil in Harnstoff über, ein kleiner Theil wird unverändert ausgeschieden,
- 2) Das Sarkosin verhält sich im Wesentlichen gleich, nur ist der unverändert ausgeschiedene Antheil etwas grösser. Neben dem Harnstoff scheint aus dem Sarkosin auch etwas Methylhydantoin zu entstehen, mit aller Bestimmtheit hat sich der Nachweis dafür nicht führen lassen.»

Für den Menschen geben Baumann und v. Mering¹⁾ an, dass ein grosser Theil des Sarkosins unverändert ausgeschieden wird, Methylhydantoinensäure in irgend nennenswerther Menge nicht gebildet wird; ob etwa ein Theil desselben in Harnstoff übergeht, haben die Autoren nicht untersucht. Auch im Harn eines mit relativ grossen Mengen Sarkosins gefütterten Hundes fanden Baumann und v. Mering sehr viel unverändertes Sarkosin. Schiffer selbst hat keine Versuche über das Verhalten des Harnstoffs bei der Sarkosinfütterung angestellt. Es liegt also zur Beurtheilung der Frage, ob ein Theil des Sarkosins in Harnstoff übergeht, kein weiteres Beobachtungsmaterial vor, als die Versuche von Baumann und von Mering und die meinigen. Nun ist

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. VIII (1875). S. 384.

gewiss nicht zu bestreiten, dass in den Versuchen der genannten Autoren ein sehr grosser Theil des Sarkosins unverändert¹⁾ ausgeschieden, also nicht in Harnstoff übergegangen ist; aber es bleibt mir doch unerfindlich, warum Schiffer meine Versuche, welche den Uebergang eines ansehnlichen Theiles des Sarkosins in Harnstoff zeigen, nicht berücksichtigt. Schiffer hätte mindestens die Gründe angeben müssen, welche ihn dazu veranlassten. Die Verpflichtung dazu war umsomehr vorhanden, als erfahrungsgemäss derartige zusammenfassende Schlussätze grosse Aussicht haben, ohne kritische Prüfung in Hand- und Lehrbücher überzugehen und auch Reklamationen an diesem Resultat nichts zu ändern pflegen, weil sie als «Polemik» nicht berücksichtigt werden. Schiffer könnte vielleicht einwenden, dass sein Satz sich auf den menschlichen Organismus beziehe, aber einerseits fehlt dieser beschränkende Zusatz, wenn er auch im Titel der Abhandlung vorkommt, andererseits ist es sehr unwahrscheinlich, dass im menschlichen Organismus sich aus Sarkosin kein Harnstoff bilden sollte, wenn es beim Kaninchen und Hund geschieht, und die Versuche von Baumann und v. Mering schliessen die Harnstoffbildung nicht aus.

Noch ein zweiter Punkt in der Abhandlung von Schiffer nöthigt mich zu einigen Bemerkungen. In einem Referat (Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften 1881, Nr. 1) über die Arbeit Schiffer's: «Ueber das Vorkommen und die Entstehung von Methylamin und Methylharnstoff im Harn»²⁾ äusserte ich mich bezüglich des Ueberganges von Methylamin in Methylharnstoff beim Kaninchen dahin, dass Schiffer in dem Nachweise dieses Vorgangs nicht weiter gekommen sei, wie ich, die Differenz also nicht in den Versuchsergebnissen liege, sondern in der Anschauung über die

¹⁾ Ob ein so grosser Theil, wie die Autoren angegeben, ist wohl zweifelhaft: Das Sarkosin ist nicht direkt nachgewiesen, sondern nach Ueberführung in Methylhydantoinensäure, es fragt sich, ob dabei nicht auch im Harn enthaltenes Methylhydantoin in Methylhydantoinensäure übergegangen ist.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 237.

Beweiskraft derselben. Ich that dieses nicht, um mir eine Priorität zu wahren, auf die ich wenig Werth lege, da ich diese Versuche eben nicht für voll beweisend halte, meine so wenig, wie die Schiffer's, sondern weil mir die Darstellung Schiffer's in der citirten Arbeit unbillig erschien. Schiffer sagt von mir, ich sei hinsichtlich der Bildung von Methylharnstoff aus Methylamin zu keinem beweisenden Resultat gekommen, während er seine Versuche in dieser Richtung für beweisend hält. Und doch ist seine Versuchsanordnung ganz dieselbe, wie die meinige, nur mit dem Unterschied, dass Schiffer den nach Methylaminfütterung entleerten Harn zum Nachweis des Methylharnstoffs mit Kalilauge kocht, ich dagegen mit Natronkalk glühe, ein Unterschied, den ich für unwesentlich halte. Schiffer hat ebenso wie ich gefunden, dass der Harn von Kaninchen nach Einführung primärer Aminbasen keine oder sehr wenig primäre Aminbasen enthält, sie dagegen liefert beim Behandeln mit starken Alkalien. Schiffer hält dadurch die Bildung von Methyl-, resp. Aethylharnstoff für bewiesen, ich nur für wahrscheinlich.

Eine weitere Uebereinstimmung meiner Resultate mit denen Schiffer's als hinsichtlich des Methylamin habe ich nie behauptet. Ich verstehe daher auch nicht, warum Schiffer in seiner Reklamation meine Sarkosinversuche in die Discussion hineinzieht, während er früher doch nur von denjenigen Versuchen gesprochen, die das Verhalten des eingeführten Methylamin betreffen und ausschliesslich auf diese sich meine Bemerkung bezieht. Das Hineinziehen der Sarkosinversuche, sowie das Citat, das Schiffer von meiner Bemerkung im Centralblatt gibt — Schiffer citirt anscheinend wörtlich mit Anführungsstrichen, lässt aber den beschränkenden Zusatz: «dieser Versuch» aus — könnte den Anschein erwecken, als hätte ich behauptet, Schiffer's Arbeit «über das Vorkommen und die Entstehung von Methylamin etc.» enthielt nichts positiv Neues. Selbstverständlich ist es mir nie in den Sinn gekommen, dieses zu behaupten, meine Bemerkung bezieht sich ganz ausschliesslich auf das Verhalten eingeführten

Methylamins beim Kaninchen und in diesem Punkt muss ich sie auch aufrecht erhalten.

In einige Sätze zusammengefasst, würden die Resultate der Versuche lauten:

- 1) Die Amidobenzoësäure geht im Organismus des Menschen, Hundes und Kaninchens zum Theil in Uramidobenzoësäure über.
- 2) Der in Uramidosäure übergehende Antheil der Amidobenzoësäure ist wechselnd, er beträgt im günstigsten Falle etwa 20%, in der Regel weniger.
- 3) Der Rest wird theils unverändert, theils als Amidohippursäure ausgeschieden, anderweitige Umsetzungen sind nicht nachweisbar.
- 4) Die Amidobenzoësäure bildet keine schwefelhaltigen Verbindungen im Organismus, verändert auch die Menge der Aetherschwefelsäuren nicht.
- 5) Die Uramidohippursäure entsteht nicht in den Nieren.
- 6) Die Bildung des Harnstoffs wird von der Bildung von Uramidosäure im Körper nicht berührt, sie verläuft vielmehr ungestört nebenher, die Uramidobenzoësäure bildet sich nicht auf Kosten des Harnstoffs.
- 7) Die Amidobenzoësäure verursacht ähnlich der Benzoësäure eine, wiewohl geringere, Steigerung des Eiweisszerfalles.