

Ueber das Vorkommen der Phenacetursäure im Harn und die Entstehung der aromatischen Substanzen beim Herbivoren.

Von

E. Salkowski.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 11. Dezember 1884.)

In gemeinschaftlich mit meinem Bruder angestellten Versuchen habe ich die Hydrozimmtsäure als frühzeitig auftretendes Produkt der Eiweissfäulniss aufgefunden; wir haben dann ausserdem festgestellt, dass diese Säure im Organismus vollständig zu Benzoësäure oxydirt und als Hippursäure ausgeschieden wird. Wir hielten uns danach für berechtigt¹⁾, anzunehmen, dass die Hippursäure des normalen Harns, soweit diese überhaupt aus dem Eiweiss und nicht aus mit der Nahrung eingeführten aromatischen Substanzen hervorgeht, gleichfalls aus im Darmkanal gebildeter Hydrozimmtsäure entsteht. Sehr zu Gunsten dieser Ansicht sprach die Beobachtung von Schotten²⁾, dass nach der Einnahme einer grossen Quantität von paraoxybenzoësaurem Natron, welches als Antisepticum wirkt, die Hippursäure aus dem Harn verschwindet.

Die Richtigkeit dieser Anschauung liess sich nun noch weiterhin prüfen. — Die Hydrozimmtsäure ist sehr häufig,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 170.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 23.

fast constant in Fäulnismischungen von Phenylessigsäure begleitet, wie wir demnächst näher ausführen werden. Von dieser Säure haben wir nachgewiesen, dass sie im Körper in die entsprechende Glycocollverbindung in «Phenacetursäure» übergeht. Gelang es, diese Säure auch im genuinen Harn aufzufinden, so war damit offenbar eine weitere, sehr wichtige Stütze für unsere Annahme gegeben. Die Phenylessigsäure ist bisher als Oxydationsprodukt des Eiweiss nicht gefunden, sondern ausschliesslich durch Fäulniss daraus zu erhalten. Man kann für sie also nicht, was für die Benzoësäure möglich ist, eine Entstehung durch Oxydation im Körper annehmen, sondern nur die Bildung durch Fäulniss im Darm. Ist man aber für diese Säure zu dieser Annahme genöthigt, so liegt gewiss kein Grund vor, für die Hippursäure von der Abstammung aus, durch Fäulniss gebildet, Hydrozimmtsäure abzusehen.

Dieses war der Gesichtspunkt, der mich zur Aufsuchung der Phenacetursäure im Harn bestimmte.

Es gelang mir nun in der That wiederholt, bei der Verarbeitung von je 5 Liter ganz frischen menschlichen Harns auf Hippursäure aus den Mutterlaugen dieser Säure eine völlig weisse krystallisirte Säure vom Schmelzpunkt 142° zu isoliren, welche sich beim Erhitzen im Röhrchen und auf dem Platinblech wie Phenacetursäure verhielt und aller Wahrscheinlichkeit nach die gesuchte Säure war, allein stets war ihre Menge äusserst gering und sie wurde zudem nicht constant gefunden. Sowie die Verarbeitung des Harns neben Hippursäure Benzoësäure ergab, war von Phenacetursäure nichts zu entdecken. Die Säure scheint noch leichter zersetzlich zu sein, wie die Hippursäure. Dieser Umstand liess auch die Verarbeitung grosser Mengen menschlichen Harns wenig aussichtsvoll erscheinen, und so wandte ich mich zunächst dem an aromatischen Substanzen so reichen Pferdeharn zu.

Der freundlichen Vermittlung des Hrn. Prof. Dieckerhoff an der hiesigen kgl. Thierarzneischule verdankte ich den während 48 Stunden mit besonderen Cautelen sorgfältig

gesammelten Harn eines gesunden Pferdes (Wallach), das mit 2 kg. Hafer, 2 kg. Heu, 1 kg. Weizenkleie und einer nicht genau bestimmten Quantität Häckselstroh pro Tag gefüttert war. Zur Ermittlung des Gehaltes an Hippursäure und vorläufiger Untersuchung auf Phenacetursäure wurde 1 Liter des Harns auf etwa 200 cbcm. eingedampft, mit 800 cbcm. Alkohol von 95 % wieder auf 1 Liter aufgefüllt, nach 24 Stunden filtrirt, mit Alkohol nachgewaschen, die alkoholischen Auszüge verdampft, mit Salzsäure versetzt und nach einigem Stehen mit alkoholhaltigem Aether geschüttelt. Hierbei schied sich der grösste Theil der Hippursäure als schneeweisses Pulver ab, das abfiltrirt, gewaschen, getrocknet 4,9 gr. wog und sofort den Schmelzpunkt 185° zeigte. Die noch in wässriger Lösung befindliche Hippursäure wurde in ätherische Lösung übergeführt, diese nach dem Abdestilliren eines Theils des Aethers, anhaltend mit Natriumcarbonatlösung geschüttelt. Die alkalische Lösung eingedampft, nochmals in Alkohol aufgenommen, dieser verdunstet und der Rückstand mit Salzsäure angerührt. Die nach 24 Stunden fast ganz trockene Masse wurde mit Aether verrieben, welcher Benzoësäure aufnahm. Das Gewicht der letzteren betrug nach der Reinigung (Schmelzpunkt 121°) 0,15 gr.

Die rückständige Hippursäure wurde mit Wasser gewaschen, in heissem Wasser gelöst, die heisse trübe Lösung durch Filtriren geklärt. Aus dieser Lösung wurden drei successive auskrystallisirende Fractionen erhalten, deren Gewicht nach dem Trocknen betrug:

a) 0,382 gr.

b) 0,572 "

c) 0,8921)¹

1,846 gr.

Die Schmelzpunkte waren nach einmaligem Umkrystallisiren für a) 182, b) 186, c) schon unter 140. Das oben erwähnte Waschwasser lieferte beim Eindampfen etc. noch

¹) Das Gewicht dieser Fraktion ist erst nach einmaligem Umkrystallisiren bestimmt.

0,493 gr. Säure. Dieselbe begann unter 140° zu schmelzen, war jedoch erst bei etwa 180° völlig geschmolzen. Zu obigen 1,846 gr. addirt, ergeben sich 2,339 gr., somit im Ganzen 7,239 gr., was mit der durch N-Bestimmung im Aetherauszug ermittelten Menge = 7,59 sehr nahe übereinstimmt.

Die Phenacetursäure war offenbar in der leicht schmelzenden Fraction zu suchen. Durch Waschen derselben mit Aether und mehrmaliges Umkrystallisiren aus Wasser konnte sie aus dieser in der That leicht erhalten werden. Im Ganzen wurden aus 1 Liter Harn 0,5 gr. erhalten, davon 0,32 gr. vom richtigen Schmelzpunkt 143° , 0,18 gr. vom Schmelzpunkt 136° . Auf dieselbe oder sehr ähnliche Weise wurde noch wiederholt Phenacetursäure aus dem Harn erhalten.

Zur Identificirung diene ausser der charakteristischen Krystallisation in Blättchen die Elementaranalyse und die Spaltung durch Salzsäure.

Eine Quantität der erhaltenen Säure wurde eine halbe Stunde lang mit rauchender Salzsäure gekocht, schliesslich verdampft, der Rückstand mit Wasser übergossen und dadurch krystallinische Blättchen abgeschieden, die bei 73° schmolzen, also unzweifelhaft Phenyllessigsäure waren. Die wässrige salzsaure Lösung wurde mit feuchtem, kohlen-sauren Silber erwärmt, das Filtrat entsilbert und eingedampft. Das auskrystallisirende Glycocoll war leicht an seinem Habitus, dem süssen Geschmack und der Auflösung von Kupferoxyd mit blauer Farbe zu erkennen.

1. 0,2004 gr. der Säure mit chromsaurem Blei und vorgelegtem Kupfer verbrannt, gab 0,1160 H_2O und 0,4570 CO_2 .
2. 0,2008 gr. gab 0,1086 H_2O und 0,4580 CO_2 .
3. 0,2154 gr mit Natronkalk verbrannt, NH_3 in Salzsäure aufgefangen etc. erforderte 6,8 cbcm. Ag-Lösung, von der 1 cbcm. = 0,01 Na Cl.

Berechnet :		Gefunden :		
		1.	2.	3.
C	62,18	62,14	62,20	—
H	5,70	6,43	6,01	—
N	7,25	—	—	7,56

Die Darstellung der Phenacetursäure aus dem Pferdeharn lässt sich natürlich sehr vereinfachen, sie kommt stets

darauf hinaus, die durch Aetherausschüttelung erhaltenen Säuren fraktionirt zu krystallisiren und diejenige Fraction in Arbeit zu nehmen, deren Schmelzpunkt weit unter dem der Hippursäure liegt: meistens zeigt eine Fraction, nicht immer die letzte, dieses in sehr ausgesprochenem Grade und die Reindarstellung durch Waschen der abgepressten Säure mit Aether und Umkrystallisiren aus Wasser unter Zufügung von etwas Kohle gelingt dann überraschend leicht. Die Ueberführung der Säure aus der ätherischen Lösung in die wässerig-alkalische ist allerdings ein Umweg, hat aber doch auch ihre Vorzüge, da man dabei das Kresol grösstentheils los wird.

Zur schnellen Constatirung der Säure empfehle ich folgendes Verfahren: 1 Liter Pferdeharn, (resp. mehr, wenn der Harn nicht so concentrirt ist) wird auf 200 ccm. verdampft, mit 800 ccm. Alkohol aufgenommen, der Auszug verdunstet, in Wasser gelöst, mit Salzsäure stark angesäuert, die Säuren in Aetherlösung übergeführt, aus dieser in wässerig-alkalische, aus dieser nach dem Ansäuern mit Salzsäure wieder in Aetherlösung. Der beim Abdestilliren des Aethers bleibende Syrup wird möglichst von Aether befreit, dann in demselben Kolben mit 50—80 ccm. Wasser zum Sieden erhitzt, die Lösung 24 Stunden sich selbst überlassen, dann abfiltrirt, das Filtrat auf etwa 15 ccm. eingedampft: beim Erkalten krystallisirt in der Regel Phenacetursäure ziemlich rein aus. Oft treten schon bei einmaligem Umkrystallisiren der auf Thonplatten gut abgepressten Säure aus Wasser die charakteristischen Blättchen auf, die sehr leicht von den Nadeln der Hippursäure zu unterscheiden sind. Die Schwerlöslichkeit der trockenen Säure in Aether, der Stickstoffgehalt, der Schmelzpunkt (143°) dienen zur weiteren Characterisirung.

Ueber die relative Menge der Phenacetursäure im Verhältniss zur Hippursäure lässt sich so lange nichts sagen, als man nicht eine bessere Trennungsmethode besitzt, unbedeutend ist sie jedenfalls nicht. Dass sie bisher übersehen wurde, ist aus dem üblichen Darstellungsverfahren leicht erklärlich: sie fällt beim Ansäuern des eingedampften Harns mit Salzsäure nicht aus, sondern bleibt in der

salzsauren Lösung. Man kann daher auch diese zum Ausgangspunkt nehmen, mit Aether schütteln etc. Dieses Verfahren führt bei grösseren Harnmengen schnell zum Ziel.

Mit dem Nachweis der Phenacetursäure dürfte der Beweis erbracht sein, dass die Hippursäure aus der, durch Fäulniss von Eiweiss im Darm entstehenden Hydrozimmtsäure hervorgeht, insoweit nicht die Abstammung aus präformirten aromatischen Substanzen in Betracht kommt. Dieser Punkt ist es, auf den wir noch kurz eingehen müssen.

Die 24stündige Quantität der Hippursäure, resp. Phenacetursäure beträgt im vorliegenden Falle rund 15 gr. Nach unseren Versuchen sind aus 100 gr. Eiweiss durch Fäulnisszersetzung und Verfütterung der entstandenen aromatischen Säuren nicht mehr wie höchstens 2 gr. Hippursäure¹⁾ zu erhalten. Somit müssten zur Bildung von 15 gr. Hippursäure 1750 gr. Eiweiss im Darm durch Fäulniss zerfallen und wenn wir selbst annehmen, dass die Quantität der gebildeten aromatischen Säuren doppelt so gross sein kann, immer noch 375 gr. Nun betrug die Quantität des zersetzten Eiweiss nach Massgabe des ausgeschiedenen Stickstoffs (65,34 gr.), etwa 400 gr. pro die. Auch wenn wir annehmen, dass nicht aller Stickstoff des im Darm zersetzten Eiweiss im Harn erscheint, ist es unmöglich, die ganze Quantität der Hippursäure vom zersetzten Eiweiss abzuleiten. Eine solche Annahme würde wenigstens unsere Vorstellungen über die Ernährung bei den Pflanzenfressern völlig auf den Kopf stellen und wir werden gewiss weit mehr Grund haben, zu vermuthen, dass in den Futterstoffen noch unbekannt, der Benzoësäure nahestehende Verbindungen in beträchtlicher Menge²⁾ präformirt vorhanden sind, ehe wir uns zu dieser Annahme entschliessen.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse für das Phenol.

¹⁾ Resp. Phenacetursäure, als Hippursäure berechnet.

²⁾ Was bisher von solchen im Harn nachgewiesen ist, kommt der Menge nach kaum in Betracht. — Meissner und Shepard sehen bekanntlich die Cuticularsubstanz als Quelle der Hippursäure an.

Tappeiner¹⁾ findet es schon bedenklich, eine Zersetzung von 10⁰/₀ des Eiweiss im Darmkanal unter Bildung von Phenol beim Pferd anzunehmen — so gross müsste seiner Rechnung nach der Umfang der Zersetzung sein. Diese Schätzung von Tappeiner wäre aber sicher viel zu niedrig. Tappeiner geht von der von J. Munk und Tereg²⁾ ermittelten durchschnittlichen Phenolausscheidung von 3 gr. pro die aus. Unter der Voraussetzung, dass 100 gr. Eiweiss 5 gr. Phenol liefern können, würden zur Bildung von 3 gr. Phenol 60 gr. Eiweiss nöthig sein; weiterhin nimmt Tappeiner 600 gr. resorbirtes Eiweiss pro die an, somit 10⁰/₀ Verlust durch Fäulniss.

Die Unterlagen dieser Rechnung sind sehr anfechtbar. Zunächst erscheint, wie zahlreiche übereinstimmende Versuche ergeben haben, (Schaffer, Tauber, Auerbach, J. Munk) bei Verabreichung von Phenol nur etwa die Hälfte desselben im Harn wieder. Es liegt kein Grund vor, anzunehmen, dass das im Darm entstehende und langsam resorbirte «Phenol», wenn es auch zum grossen Theil Kresol ist, sich wesentlich anders verhält. Eine Ausscheidung von 3 gr. Phenol, resp. Kresol, berechtigt uns, auf eine Bildung von 6 gr. zu schliessen. Zweitens ist die Annahme, dass 100 gr. Eiweiss 5 gr. Phenol bilden könnten, viel zu hoch gegriffen. Wir können nach unseren Versuchen³⁾ höchstens 1,5⁰/₀ zugeben, in den Versuchen von Brieger⁴⁾ ist die Menge noch viel kleiner. Zur Lieferung des Phenols wären somit mindestens 400 gr. Eiweiss erforderlich. Mit anderen Worten: Da die Stickstoffausscheidung in den Versuchen von J. Munk und Tereg bei obiger Phenolausscheidung etwa 60 gr. pro die betrug, so müsste sämtliches Eiweiss im Darmkanal durch Fäulniss zerfallen, resp. fast sämtliches, wenn vielleicht ein Theil des zerfallenden Eiweiss seinen Stickstoff

1) Zeitschrift für Biologie, Bd. XX, S. 230.

2) Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiolog. Abtheilg. Suppl. für 1880.

3) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XIII, S. 189.

4) Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 134.

nicht in den Harn sendet. Nehmen wir aber auch nur 3 gr. gebildetes Phenol an, so gelangen wir immer noch zu 200 gr. durch Fäulniss zersetzten Eiweiss, was offenbar nicht annehmbar ist. Diese Consequenzen sind also wohl geeignet, Zweifel an der Richtigkeit der nach Baumann's¹⁾ Vorgang allgemein und auch von mir bisher acceptirten Anschauung wachzurufen, dass das Phenol auch beim Pflanzenfresser ausschliesslich aus dem Eiweiss der Nahrung durch Fäulniss hervorgeht. Mit dieser Annahme würden unsere bisherigen Anschauungen über die Resorption des Eiweiss und den Ernährungsvorgang unvereinbar sein.

Auch J. Munk ist bereits (l. cit.) durch die Beobachtung, dass die Phenolausscheidung bei Fütterung mit Wiesenheu besonders gross war und herunterging, als die Menge desselben verringert wurde, zu der Vermuthung geführt, dass mit dem Wiesenheu vielleicht aromatische Substanzen eingeführt sein möchten, aus denen sich Phenol leicht und in grösserer Menge abspaltet.

Endlich widerspricht auch die relativ geringe Ausscheidung von Indican der Annahme einer so umfangreichen Eiweisszersetzung. Wenn wir uns auch der Ansicht von Hoppe-Seyler anschliessen, dass die bisherigen Methoden der Indicanbestimmung zu niedrige Werthe geben, so wird doch die Indigoausscheidung mit 0,5 gr. pro die beim Pferd nicht zu niedrig angenommen sein. Da das Indol nach den Versuchen von Baumann²⁾ mindestens dem grössten Theile nach als Indican ausgeschieden wird, so werden wir also auch nicht mehr, wie höchstens 0,5 gr. Indol als 24stündige im Darm gehildete Menge annehmen können. Diese Quantität kann wenigstens, wie unsere früheren Versuche zeigen, aus 50 gr. Eiweiss entstehen. Lassen wir das Phenol ausschliesslich aus dem Eiweiss hervorgehen, so erhebt sich die Frage, was denn aus den entsprechenden grossen Quantitäten Indol wird. — Ich verkenne nicht, dass die Unterlagen

1) Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 322.

2) Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 67.

dieser Berechnungen etwas willkürlich sind und dass zu einer fruchtbaren Discussion dieser Frage eine wesentliche Unterlage bisher fehlt, nämlich quantitativ durchgeführte Fäulnisversuche mit pflanzlichen Eiweisskörpern, jedenfalls aber kann man aus der Indicanausscheidung kein Argument für die Ableitung des Phenols aus Eiweissfäulnis entnehmen.