

Zur Kenntniss der Eiweissfäulniss III: Ueber die Bildung der nicht hydroxylierten aromatischen Säuren.

Von

E. Salkowski in Berlin.

(Der Redaction zugegangen am 2. April 1885.)

I. Die Abscheidung der flüchtigen aromatischen Säuren.¹⁾

Bereits vor einer Reihe von Jahren haben wir mitgetheilt²⁾, dass bei der Fäulniss verschiedener Eiweisskörper sich constant flüchtige aromatische Säuren bilden, von denen zwei, nämlich die Phenyllessigsäure und die Phenylpropionsäure (Hydrozimmtsäure) bestimmt erkannt werden konnten. Die Methode, deren wir uns damals zur Isolirung der Säuren aus dem Fäulnissgemisch bedienten und die wir auch in den späteren Versuchen befolgten, ist bereits in der Abhandlung über die Skatolcarbonsäure³⁾ und zwar in dem daselbst gegebenen Schema über die Verarbeitung des Destillationsrückstandes (l. c. S. 10) angedeutet, wir haben demselben nur Weniges zur Erläuterung hinzuzufügen.

Die Hauptmenge der flüchtigen aromatischen Säuren findet sich in dem Aetherauszug Bb 1 β (siehe das Schema l. c.), ein geringer Bruchtheil geht jedoch bei der ersten Destillation der nicht angesäuerten Faulflüssigkeit, vermuthlich als Ammonsalz, in das erste Destillat über. Wie dieses Destillat behandelt wurde, um daraus das Indol resp. Skatol zu isoliren, ist bereits in der Abhandlung über die Bildung des Indols

1) Abschnitt I und II nach gemeinsamen Versuchen mit meinem Bruder H. Salkowski in Münster i. W.

2) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XII, S. 107. S. 648. Bd. XIII, S. 189. Vergl. auch diese Zeitschrift, Bd. II, S. 424.

3) Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 8.

und Skatols¹⁾ besprochen. Es ist dort (l. c. S. 428) angegeben, dass die aus dem angesäuerten wässrigen Destillat hergestellte ätherische Lösung durch Schütteln mit Natronlauge von Phenol resp. Kresol und flüchtigen Säuren befreit wurde. Es handelt sich hier somit um die Trennung der in gemeinsamer alkalischer Lösung befindlichen Säuren und des Phenols. Zu dieser Natronlösung wurde zunächst noch die alkalische Flüssigkeit B II (vergl. das beistehende Schema) hinzugefügt, welche bei

Schema der Verarbeitung des Fäulnisdestillates.

Das Destillat wird mit Salzsäure angesäuert, mit Kupfersulfat versetzt, filtrirt, mit Aether geschüttelt.

Aetherauszug mit Natronlauge geschüttelt.	Saure wässrige Lösung, enthält NH_4Cl etc.
---	--

Alkalische Lösung A, wird mit Salzsäure angesäuert, mit Na_2CO_3 neutralisirt, mit Aether geschüttelt.	Ätherische Lösung B, verdampft, mit NaHO destillirt.
--	---

Flüchtig I, Indol, Skatol.	Rückständige alkalische Lösung II, filtrirt, mit A vereinigt.
----------------------------	---

Ätherische Lösung I, Aether abdestillirt, Rückstand mit H_2O destillirt.	Alkalische Lösung II.
--	-----------------------

Flüchtig a: Phenol.	Rückständige alkalische Lösung B mit II vereinigt.
---------------------	--

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 417.

dem definitiven Abdestilliren des Indols geblieben war, nachdem sie vorher durch Filtriren geklärt war¹⁾; dieselbe enthielt in der Regel kein Phenol, oft aber noch Spuren von flüchtigen Säuren. Um aus dieser vereinigten alkalischen Lösung das Phenol zu entfernen, wurde in der Regel Salzsäure hinzugefügt bis zur stark sauren Reaction, wobei die Lösung sich unter Ausscheidung öligler Tropfen trübte, dann Natriumcarbonat, bis die Lösung nach starkem Schütteln nur von freier CO₂ sauer reagierte, alsdann wiederholt mit Aether geschüttelt, welcher das Phenol aufnimmt. Man ist dabei sicher, dass der Aether alles Phenol aufnimmt: das in der Flüssigkeit vorhandene Natriumbicarbonat bindet in der Kälte kein Phenol. Dagegen nimmt der Aether allerdings auch Spuren von Natriumsalzen flüchtiger Säuren auf. Diese bleiben zurück, wenn die Aetherlösung bei gelinder Wärme verdunstet und das Phenol durch Wasserdampf abgetrieben wird. Die rückständige alkalische Flüssigkeit A Ia wird wieder zu der Hauptmenge zugesetzt und die gesammten in Alkali gelösten Säuren dann mit der bei der Verarbeitung des Destillationsrückstandes unter B (vergl. das Schema Bd. IX, S. 10) erhaltenen Lösung resp. dem Verdampfungsrückstand derselben vereinigt, so dass also auch die in das erste Destillat übergegangenen Fette und aromatischen Säuren in den Aetherauszug B I b 13 gelangten.²⁾

Der beim Abdestilliren dieses Aetherauszuges bleibende ölige Rückstand, welcher also flüchtige Säuren, Oxysäuren, Skatolcarbonsäure und Bernsteinsäure enthielt, wurde anhaltend mit einem starken Dampfstrom behandelt, welcher vorher ein gelinde erhitztes Kupferrohr passirte. Zu stark darf man dieses nicht erhitzen, da sonst die Skatolcarbonsäure zu einem beträchtlichen Theil verharzt. In der Regel

1) War diese Flüssigkeit durch Filtriren allein nicht vollständig zu klären, so wurde die Klärung durch Zusatz einer kleinen Quantität Chlorbaryum und etwas Natriumcarbonat bewirkt.

2) In den älteren Versuchen sind die in das erste Destillat übergegangenen Säuren nicht immer berücksichtigt. — Diese Zeitschrift. Bd. IX, S. 10.

würden die Dämpfe dann direkt in Natronlauge geleitet, welche sich natürlich stark erhitzt. Man thut gut, am Anfang den Dampfstrom nicht zu stark zu wählen, da sonst zuviel von den Säuren unabsorbirt entweicht. Ganz verhüten lässt sich der Verlust nicht, indessen handelt es sich dabei vorwiegend um flüchtige fette Säuren, während die aromatischen hauptsächlich später übergehen. Dagegen erleidet man unvermeidlich einen schwer zu bemessenden Verlust an aromatischen Säuren durch die stets in gewisser Menge gebildeten Hydrozimmtsäure- resp. Phenyllessigsäureäther, die sich durch ihren Geruch in unverkennbarer Weise bemerklich machen. Sie bilden sich um so reichlicher, je länger die Säuren in ätherischer, alkoholhaltiger Lösung verweilen, möglichste Beschleunigung der Proceduren ist daher zur Vermeidung grösserer Verluste erforderlich. Für die Bemessung der vorzulegenden Quantität Natronlauge giebt die vorhergehende Verarbeitung des Destillationsrückstandes hinreichenden Anhalt: man wird etwa dieselbe Quantität vorzulegen haben, welche man zur Alkalisierung des Aetherausatzes B I gebraucht hat resp. etwas mehr. Es braucht kaum bemerkt zu werden, dass der das Säuregemisch enthaltende Kolben durch eine kleine Flamme erhitzt wird, wenn die Quantität der Flüssigkeit durch Condensirung von Wasserdampf zu gross geworden ist.

Die vollständige Austreibung der flüchtigen Säuren nimmt eine recht geraume Zeit in Anspruch, und doch ist auf eine möglichst vollständige Austreibung Werth zu legen, nicht allein, weil sonst ein Verlust an flüchtigen Säuren eintreten würde, sondern auch, weil die nicht flüchtigen Säuren viel leichter rein darzustellen sind, wenn die flüchtigen Säuren möglichst sorgfältig entfernt wurden. Im Allgemeinen waren hiezu (bei rund 400 gr. trockenem Eiweiss als Fäulnissmaterial) 24 bis 36 Stunden erforderlich. Als Kriterium diente das Verhalten einer zur Probe vorgelegten sehr schwach alkalischen Flüssigkeit (1 bis 2 cem. $\frac{1}{10}$ Normalnatron enthaltend): war diese nach einer Stunde noch alkalisch, so wurde die Destillation als beendet angesehen.

Die gesammten alkalischen mit Säuren beladenen Lösungen wurden nun auf dem Wasserbad eingedampft, nach dem Erkalten mit Salzsäure stark angesäuert¹⁾ und mit Aether ausgeschüttelt. Der beim Verdunsten der Aetherauszüge bleibende Rückstand wurde aus einem Siedekölbchen mit eingesetztem Thermometer destillirt. Da der Siedepunkt der Phenyllessigsäure bei 262° liegt, der Siedepunkt der Phenylpropionsäure (Hydrozimmtsäure) gegen 280°, der Siedepunkt der unter den Fäulnissproducten aufgefundenen flüchtigen Fettsäuren, welche hier in Betracht kommen, weit tiefer (die normale Valeriansäure siedet bei 184—185°, die Isovaleriansäure bei 176°, die normale Capronsäure bei 205°; die Palmitinsäure und Stearinsäure kommen nicht in Betracht, da ihre Baryumsalze in Wasser unlöslich sind), so ist eine Trennung durch fractionirte Destillation sehr wohl ausführbar. In der Regel wurde die Vorlage gewechselt, wenn der Siedepunkt auf 260° gestiegen war. Natürlich setzt dieses Verfahren eine nicht zu kleine Menge Material voraus und dieses ist mit ein Grund, warum fast alle unsere Fäulnissversuche mit verhältnissmässig sehr grossen Mengen Eiweisssubstanz ausgeführt sind. Die Destillation wurde bis auf wenige im Fractionskölbchen bleibende Tropfen fortgesetzt. Für die Reindarstellung der Säuren ist es übrigens zweckmässiger, die Destillation nicht bis auf die letzten Tropfen fortzusetzen: es entstehen dabei gelb gefärbte stechend riechende Producte, welche das Auskrystallisiren der Säure zu erschweren scheinen.

Durch das geschilderte Verfahren wurde also ein öliges Liquidum erhalten, durchschnittlich im Gewicht von 5 bis 6 gr. (aus rund 400 gr. Eiweiss), das nun an einem kühlen Ort sich selbst überlassen wurde. Dabei erstarrte es entweder dem grössten Theile nach oder es entstand eine geringe krystallinische Ausscheidung. Im ersteren Falle wurde die Krystallmasse zwischen Papier stark abgepresst oder auch auf Thonplatten abgesogen, im letzteren Falle auf Thon-

¹⁾ Zur Erkennung der Gegenwart freier Mineralsäure diene die Reaction einiger Tropfen der Flüssigkeit mit Genthianaviolett nach dem ersten Ausschütteln mit Aether.

platten ausgegossen, wobei sich der flüssige Antheil schnell einzog und die Krystalle rein zurückblieben. Die so erhaltene Substanz diente direct oder nach Umkrystallisiren aus Wasser, öfters auch nach Sublimation zwischen Uhrgläsern zu Schmelzpunktbestimmungen und Analysen.

So wurde aus 125 gr. mit Wasser erschöpftem trockenen Muskelfleischpulver bei 13tägiger Fäulniss 0,7 gr. reine Hydrozimmersäure erhalten.¹⁾ Die Säure schmolz bei 47—48° (Schmelzpunkt der Hydrozimmersäure 48°), lieferte bei Oxydation mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat Benzoësäure, beim Nitriren eine nach einmaligem Umkrystallisiren aus Wasser bei 161° schmelzende Nitrosäure (Paranitrohydrozimmersäure schmilzt bei 163—164°).

0,2065 gr. der Säure (über SO_4H_2 getrocknet) gaben 0,5430 CO_2 und 0,1266 H_2O .

	Berechnet:	Gefunden:
C	72,0 %	71,71 %
H	6,67 »	6,81 »

0,1527 gr. des Silbersalzes gaben 0,0635 gr. Ag = 41,58% (ber. 42,02%).

Phenylelessigsäure aus verschiedenen Versuchen stammend, ergab folgende analytische Werthe:

0,2066 gr. (über SO_4H_2 getrocknet) gaben 0,5350 CO_2 und 0,1168 H_2O .

	Berechnet:	Gefunden:
C	70,58 %	70,62 %
H	5,88 »	6,17 »

0,3788 gr. des Silbersalzes gaben 0,1498 gr. Ag = 44,21% (ber. 44,44%).

Eine Bestätigung liegt nur von Stöckly²⁾ vor, der unter Nencki's Leitung aus faulendem Gehirn reichlich Hydrozimmersäure erhielt: aus 5 Kilo 20 gr. reine Säure.

Die näheren Verhältnisse über das Auftreten der einen oder anderen Säure werden weiter unten erörtert werden.

II. Die Constanz des Auftretens der Säuren.

Der Umstand, dass die aus dem öligen Destillat auskrystallisirten Säuren stets sehr annähernd den Schmelzpunkt der Hydrozimmersäure oder den der Phenylelessigsäure zeigten, bewog uns Anfangs zu der Annahme, dass, der Regel

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XII, S. 107.

²⁾ Journal für practische Chemie, N. F., Bd. 24, S. 17.

nach, in einer Fäulnismischung nur eine der beiden Säuren vorhanden sei. Die geringen Abweichungen, welche die Schmelzpunkte häufig nach unten hin zeigten, liessen sich ungezwungen auf Verunreinigungen beziehen, welche die Schmelzpunkte herabdrückten. Dagegen konnte uns nicht entgehen, dass die Quantität der in fester Form erhaltenen aromatischen Säuren eine sehr wechselnde war; ebensowenig konnte es uns entgehen, dass die Presspapiere resp. die Thonplatten noch beträchtliche Mengen von Homologen der Benzoösäure enthielten, wie einfache Reactionen mit den aus diesen hergestellten Auszügen (z. B. die Lücke'sche, auf Nitrobenzol-Bildung beruhende Reaction) ergaben. Auch dieser Umstand erschien indessen nicht unerklärlich; es war sehr wohl denkbar, dass sich bei der Fäulniss noch höhere Homologe der Benzoösäure (Phenylbuttersäure, Phenylvaleriansäure etc.) bildeten, deren Schmelzpunkte tiefer, wie der der Phenylpropionsäure liegen. Dieselbe Erklärung würde dann auch zulässig sein für die Fälle, in denen die Destillate überhaupt keine krystallinischen Ausscheidungen lieferten, sondern auch bei längerer Aufbewahrung ölförmig blieben, resp. die krystallinische Ausscheidung minimal war.

Inzwischen wurden indessen doch Beobachtungen gemacht, welche Zweifel an der Richtigkeit dieser Deutungen erweckten. Zunächst wurde bei einem Fäulnissversuch mit 2 Kilo Fleisch von 7tägiger Dauer (Nr. 8 in der Tabelle diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 432), der wesentlich Hydrozimmtsäure lieferte, in der Gruppe der Oxysäuren¹⁾ noch eine nicht unbeträchtliche Quantität — 0,862 gr. — Phenylessigsäure gefunden.

Weitere Anhaltspunkte lieferten die Versuche von H. Salzkowski²⁾ über das Verhalten der Mischungen von Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure. Es zeigte sich hierbei zunächst, dass aus diesen Gemischen, noch wenn sie aus 60%

¹⁾ In Folge von unzureichender Behandlung mit Wasserdampf an dieser Stelle.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XVIII, S. 323.

Hydrozimmtsäure und 40% Phenylessigsäure bestanden, bei etwas kühler Zimmertemperatur eine Säure vom annähernden Schmelzpunkt der Phenylessigsäure (76°) auskrystallisirte, während ein grosser Theil flüssig blieb; fernerhin dass aus Gemischen von 80% Hydrozimmtsäure und 20% Phenylessigsäure sich reine Hydrozimmtsäure vom richtigen Schmelzpunkt krystallinisch ausschied, während ein grosser Theil der Hydrozimmtsäure im Gemisch mit Phenylessigsäure flüssig blieb. Endlich constatirte H. Salkowski noch, dass ein Gemisch von 35% Hydrozimmtsäure und 65% Phenylessigsäure, direct untersucht — ohne vorgängige Abscheidung einer Säure durch Krystallisation — schon bei 21° schmolz. Nach diesen Beobachtungen konnten die früheren Anschauungen nicht mehr aufrecht erhalten werden. Die Bestimmung des Schmelzpunktes einer auskrystallisirten Säure berechtigte danach nicht mehr, nur diese Säure anzunehmen, ebenso konnten die früher ausgeführten Gewichtsbestimmungen der auskrystallisirten und abgepressten Säure keinen Werth mehr beanspruchen, da bei ihnen ein unberechenbarer, sicher oft sehr grosser Bruchtheil der Wägung entgangen war. Endlich war auch für die allerdings seltenen Fälle, in denen das Destillat ganz oder, abgesehen von einer geringen Ausscheidung, flüssig blieb, eine befriedigende Erklärung gewonnen. Die älteren Versuche haben also nur noch insofern Werth, als sie Beweise abgeben für die Constanz der Bildung aromatischer nicht hydroxylierter Säuren und allenfalls für das Ueberwiegen der einen oder anderen Säure. Nur aus diesem Grunde sollen sie hier summarisch angeführt werden.

Bildung von Hydrozimmtsäure wurde constatirt:

1. In 9 Versuchen mit Fleisch von 2 bis 16 Tagen Dauer (wozu noch ein bei gewöhnlicher Temperatur angestellter Versuch kommt).
2. In 2 Versuchen mit Blutfibrin von 3 resp. 7 Tagen Dauer.
3. In einem Versuch mit Fleischfibrin von 13 Tagen Dauer.
4. In einem Versuch mit Pankreaspepton von 7 Tagen Dauer.

Bildung von Phenyllessigsäure wurde festgestellt:

1. In 3 Versuchen mit Serumalbumin von 37—39 Tagen Dauer.
2. In 2 Versuchen mit Fleisch von 7 resp. 14 Tagen Dauer. — Hierzu kommt noch der erwähnte Versuch Nr. 8 mit Fleisch, in dem beide Säuren neben einander gefunden wurden.

Ich hebe dabei nochmals hervor, dass, wo nur eine Säure gefunden, die andere keineswegs ausgeschlossen ist.

Im Ganzen wurde also in 20 Einzelversuchen mit grösseren Quantitäten verschiedener Eiweisskörper die Bildung von flüchtigen aromatischen Säuren constatirt, in keinem darauf untersuchten Fall vermisst.

Dazu kommen noch die neueren Versuche, an Zahl 10, grösstentheils das Fibrin betreffend, über welche hier genauer berichtet werden soll. Alles in Allem ist also in 30 Versuchen mit verschiedenem Material die eine oder die andere Säure gefunden, so dass wir wohl auf keinen Widerspruch stossen werden, wenn wir den Satz aufstellen:

Nicht hydroxylierte aromatische Säuren und zwar Homologe der Benzoësäure sind ein constantes Product der Eiweissfäulniss.

III. Die Trennung der Säuren und ihre Mengenverhältnisse.

Die Frage nach der Quantität der aus dem Eiweiss durch Fäulniss gebildeten aromatischen Säuren bietet nicht weniger physiologisches, wie chemisches Interesse. Ist auf der einen Seite die genaue Feststellung der Mengenverhältnisse ein nicht unwichtiger Beitrag zur Kenntniss der Constitution des Eiweiss, so liefert andererseits die Beantwortung dieser Frage die Unterlagen für unsere Anschauungen über die Entstehung eines höchst interessanten Stoffwechselproductes namentlich der Pflanzenfresser, der Hippursäure. Ich habe daher dieser Frage ein besonders eingehendes Studium zugewendet.

Man konnte daran denken, das über 260° übergehende Destillat zu wägen und als Summe von Phenyllessigsäure und

Hydrozimmtsäure anzusehen. Allein einerseits ist der Nachweis, dass dieses Destillat in der That aus nichts Anderem wie den genannten Säuren besteht, sehr schwer zu führen, andererseits ist man auch nicht sicher, alle aromatische Säure wirklich in dem Destillat zu haben. Man kann sich leicht überzeugen, dass schon von etwa 200° ab, wenn auch vielleicht nur sehr kleine Quantitäten der Säuren übergehen, und es ist auch nicht gut ausführbar, die Säuren bis auf den letzten Tropfen abzudestilliren. Auch im besten Falle würde man dadurch nur die Gesammtmenge der Säuren erfahren. Die Trennung derselben ist, wie die Versuche von H. Salkowski ergeben haben, nach dem von Liebig für die Trennung der flüchtigen Fettsäure angegebenen Verfahren zwar ausführbar, aber sehr umständlich und natürlich nicht quantitativ.

Bei dieser Sachlage kam ich auf die Idee, den thierischen Organismus zur Ueberführung der Säuren in eine quantitativ leicht bestimmbare Form und zur Trennung der beiden Säuren zu benutzen.

Frühere Versuche von uns¹⁾ hatten ergeben, dass bei Kaninchen eingegebene Hydrozimmtsäure fast quantitativ als Hippursäure, Phenyllessigsäure dagegen als Phenacetursäure ausgeschieden wird. Verfüttert man also die aromatischen Säuren, so werden dieselben: 1. in äusserst leicht krystallisirbare schwerlösliche Verbindungen übergeführt, deren Menge sich sowohl direct, als auch indirect mit Leichtigkeit und ziemlich genau bestimmen lässt, und es ist 2. möglich, die entstandenen Säuren zu trennen, ja selbst die Phenacetursäure annähernd der Menge nach zu bestimmen.

Das eingehaltene Verfahren gestaltete sich nach einigen Vorversuchen folgendermassen:

Das durch Abdestilliren des Aethers erhaltene Gemisch flüchtiger fetter und aromatischer Säuren wurde der Destillation unterworfen, dieselbe bei 200° unterbrochen. Der Rückstand mit Aetznatron schwach alkalisirt, zur Entfernung flüchtiger, nicht saurer Producte auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft, dann wiederum in wenig Wasser gelöst, die

1) Diese Zeitschrift, Bd. VII. S. 161.

meistens etwas trübe Lösung mit Salzsäure genau neutralisirt, einige Tropfen Natriumcarbonat hinzugesetzt, auf 100 cbcm. aufgefüllt. Die Lösung wurde in zwei gleiche Theile getheilt, die eine Hälfte diente zum Fütterungsversuch, die andere zur Darstellung der Säure.

Der Fütterungsversuch war in folgender Weise angeordnet:

Das zu dem Versuch ausgewählte Kaninchen von 2 bis 3 Kilo Körpergewicht erhielt einige Tage Kartoffeln als ausschliessliche Nahrung — und zwar in den Tagen vor der Fütterung der Säuren nur 60 bis 80 gr., da während der Fütterung mit Säuren selbst dieses geringe Quantum nicht verzehrt wurde — und 40 cbcm. Wasser pro Tag mittelst Catheter in den Magen. Die Harnentleerung wurde durch Abpressen befördert. An den drei folgenden Tagen wurde dem Thiere jedesmal $\frac{1}{3}$ der oben erwähnten neutralen Säurelösung zu 40 cbcm. verdünnt eingegeben. Der Harn floss unmittelbar nach der Entleerung in ein Gefäss mit absolutem Alkohol, eine Vorsicht, die nach den Erfahrungen von Stokvis und v. d. Velde¹⁾ über die leichte Zersetzlichkeit der Hippursäure im Harn geboten erschien. Die Harnreste wurden selbstverständlich öfters abgespült; es gelang so in der That, die Zersetzung des Harns zu verhüten. Der gesammte, in den nächsten 4×24 Stunden gelassene, in Alkohol aufgesammelte Harn wurde eingedampft, in Alkohol aufgenommen, der Rückstand sehr sorgfältig mit Alkohol nachgewaschen, die Auszüge bei gelinder Temperatur verdunstet, dann in Wasser gelöst und auf 100 cbcm. gebracht. Von dieser Lösung dienten 10 cbcm., oder wenn die Bestimmung, was häufig geschah, doppelt ausgeführt wurde, 2×10 cbcm. zur Herstellung des Aetherauszuges und Bestimmung des Stickstoffes in diesem. Der Rest = 80 cbcm., der bis zur Beendigung der N-Bestimmung kühl aufbewahrt wurde, diente zur Darstellung der Hippursäure und Untersuchung auf Phenacetursäure.

Die Herstellung des Aetherextractes und Bestimmung des Stickstoffes in diesem geschah in folgender Weise:

Die mit der Messpipette abgemessenen 10 cbcm. des obigen Auszuges wurden auf etwa 30 cbcm. verdünnt, dann stark mit Salzsäure angesäuert und sofort mit 60 cbcm. Aether unter Zusatz von 2 bis 3 Tropfen Alkohol geschüttelt. Die Ausschüttelung wurde noch 3 Mal in derselben Weise wiederholt, die durch Papier filtrirten Aetherauszüge bis auf einen geringen Rest abdestillirt. Die rückständige Lösung — etwa ausgeschiedene Hippursäure wurde vorher durch Zusatz von Alkohol in Lösung gebracht — wurde auf 80° warmen (vorher natürlich gut ausgeglühten) Natronkalk aufgetropft, der sich in einem Schälchen be-

¹⁾ Archiv für experimentale Pathologie, Bd. XVII, S. 189.

fund. Diese Procedur nimmt ziemlich viel Zeit in Anspruch, es lässt sich auch, da man das Kölbchen mit einem Gemisch von Aether und Alkohol ausspülen muss, nicht vermeiden, dass der Natronkalk etwa feucht wird, doch ist eine Zersetzung von Hippursäure resp. abgespaltenem Glycocoll beim Trocknen des Natronkalkes bei 80° nicht zu befürchten, eine Zersetzung von etwa in den Aether übergegangenem Harnstoff aber eher von Vortheil. Diejenigen Stellen des Schälchens, welche direct mit der Aetherlösung in Berührung gekommen waren, wurden mit leicht angefeuchtem Fliesspapier ausgewischt, die Papierstückchen bei der Stickstoffbestimmung, die mit Natronkalk in der Röhre ausgeführt wurde, direct in die Röhre geworfen und mit Natronkalk geschüttelt. Das Ammoniak wird in Salzsäure aufgefangen, diese abgedampft, das Chlorammonium mit Silberlösung titirt, von der 1 cbcm. = 0,01 NaCl. — In einzelnen Fällen ist auch das Verfahren von Kjeldahl angewendet: es bietet im vorliegenden Fall den grossen Vortheil, dass man den Rückstand der Aetherlösung direct in demselben Kolben mit Schwefelsäure behandeln kann, also vor allen Verlusten geschützt ist. Uebrigens muss ich bemerken, dass die Hippursäure durch Erhitzen mit Schwefelsäure, Phosphorsäureanhydrid und Kaliumpermanganat einigermassen schwierig vollständig zersetzt wird.

•Aus der erhaltenen N-Menge lässt sich die Hippursäure, also auch die Hydrozimmtsäure leicht berechnen. Natürlich kann man auf das gleichzeitige Vorkommen der Phenacetursäure hierbei nicht Rücksicht nehmen, diese erscheint vielmehr als Hippursäure berechnet, die Phenylelessigsäure also als Hydrozimmtsäure. Im vorliegenden Fall handelt es sich ja aber auch nur darum, einen Ausdruck für die Quantität der nicht hydroxylierten aromatischen Säuren zu finden, ob diese Hydrozimmtsäure oder Phenylelessigsäure, ist zunächst gleichgültig, ja es wäre in jedem Fall, auch wenn man die Säuren einzeln hätte wägen können, eine Umrechnung auf eine der beiden Säuren, sei es nun Phenylelessigsäure oder Hydrozimmtsäure, erforderlich gewesen.

Das Verfahren setzt, wie man sieht, voraus, dass bei der gewählten Fütterung keine nennenswerthen Mengen N-haltiger Substanz aus dem Harn einiger Tage in den Aether übergehen. Dies ist in der That der Fall, wie ich mich durch einige Versuche überzeugt habe. Diese sind ganz in derselben Weise ausgeführt, nur kam eine $\frac{1}{10}$ so starke Silberlösung in Anwendung, also 1 cbcm. = 0,001 NaCl.

So wurde von einem Kaninchen bei der erwähnten Fütterung der Harn in Alkohol gesammelt, in der angegebenen Weise behandelt; $\frac{1}{10}$ des in Wasser gelösten Alkoholextractes mit Salzsäure und Aether geschüttelt. Der Verdampfungsrückstand, nach Kjeldahl behandelt, forderte 5,2 cbcm. der schwächeren, also die ganze Quantität 5,2 cbcm. der stärkeren Ag-Lösung. Daraus berechnen sich 0,159 gr. Hippursäure = 0,133 Hydrozimmtsäure, z. Th. wohl scheinbare Hippursäure, da der Stickstoff z. Th. auch wohl von in den Aetherauszug übergegangenem Harnstoff herrühren kann; wenigstens habe ich bei der directen Untersuchung von solchem Harn immer nur Spuren von Hippursäure erhalten können. — In einem anderen Fall wurde für den Harn von 3 Tagen gebraucht 6,2 cbcm. = 0,189 Hippursäure = 0,158 Hydrozimmtsäure. Das sind Grössen, die für den vorliegenden Fall kaum in Betracht kommen: ich habe sie nicht in Abzug gebracht, da die Werthe für die Hippursäure aus verschiedenen Gründen in jedem Fall zu niedrig; einerseits sind Verluste bei dem complicirten Verfahren eben nicht vollständig zu vermeiden, andererseits ist anzunehmen, dass die aus der Nahrung stammende Hippursäure an den Tagen der Fütterung der Säuren noch geringer ist, da die vorangehenden Tage noch unter dem Einfluss des früheren Futters stehen, bei den Fütterungstagen dieses aber nicht mehr der Fall ist.

Der von den Stickstoffbestimmungen bleibende Rest, in der Regel $\frac{8}{10}$ der Lösung, diente zur Darstellung der Phenacetursäure und Hippursäure. Die Lösung wurde direct, ohne vorheriges Eindampfen, mit Salzsäure versetzt; diese fällt, wenigstens in dem vorliegenden Versuchen, nur Hippursäure, keine Phenacetursäure aus, da die Menge dieser relativ gering und ihre Löslichkeit in Wasser weit grösser ist, wie die der Hippursäure. Zur vollständigen Abscheidung der Hippursäure blieb die angesäuerte Lösung einige Tage stehen. Die ausgeschiedene Hippursäure ist, abgesehen von ihrer mehr oder weniger starken Färbung, ganz rein, so rein, dass sie nach einfachem Waschen mit Wasser schon sehr annähernd richtigen Schmelzpunkt zeigt. Eine geringe Quantität begleitenden amorphen Niederschlages lässt sich durch Dekantiren beseitigen. Die abgossene und dann filtrirte salzsaure Mutterlauge wurde nun mit Aether erschöpft, die Auszüge bis auf einen geringen Rückstand abdestillirt: in der syrupösen Lauge schieden sich bei längerem Stehen neben einer wechselnden Menge von Hippursäurenadeln sehr harte, derbe kleine

Krystalle von Phenacetursäure aus, eingebettet in schmierige Massen, die durch Verreiben auf porösen Thonplatten beseitigt werden konnten. Die Phenacetursäure war von den beigemischten Hippursäurenadeln durch Schlemmen mit Wasser leicht zu befreien. Nach einmaligem Umkrystallisiren aus Wasser unter Zusatz von etwas Kohle wurde die Phenacetursäure vollständig weiss und für die Gewichtsbestimmung rein genug erhalten; häufig war auch der Schmelzpunkt vollständig richtig. In einigen Fällen wurde auch abweichend hiervon der beim Verdunsten des Aetherausuges bleibende Rückstand so, wie ich es für die Darstellung der Phenacetursäure aus Pferdeharn angegeben habe¹⁾, direct mit heissem Wasser behandelt, der nach dem Erkalten filtrirte Auszug eingedampft und zur Krystallisation über Schwefelsäure gestellt u. s. w. Das erstere Verfahren ist indessen bei den kleinen Mengen, um die es sich hier handelt, wohl vorzuziehen.

In allen Fällen wurden die so aus dem Harn erhaltenen Säuren näher untersucht. Die durch directe Ausfällung mit Salzsäure erhaltene Säure erwies sich in allen Fällen als Hippursäure, aber in allen Fällen konnte auch Phenacetursäure aus dem Aetherextract erhalten werden, der Nachweis missglückte nur in dem Fibrinversuch I, welcher nur 4 Tage gedauert hatte. Da dieser Versuch der erste nach diesem Verfahren verarbeitete war, so steht noch dahin, ob hier die Phenacetursäure in der That gefehlt hat oder vielleicht übersehen ist.

Es sind noch einige Worte über die schliessliche Identificirung der Phenacetursäure zu sagen. Die Säure bildet bei langsamer Ausscheidung, wie im vorliegenden Fall, äusserst harte kleine Krystalle, dicke rhombische Tafeln mit abgerundeten Winkeln, ähnlich manchen Harnsäureformen, in ihrem äusseren Habitus durchaus verschieden von der Hippursäure; beim Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Zusatz von Kohle scheiden sich Blättchen aus, welche gleichfalls mit der in Nadeln krystallisirenden Hippursäure nicht zu ver-

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. Bd. XVII, S. 3010

wechseln sind. Weiterhin ist charakteristisch der Schmelzpunkt der getrockneten, zerriebenen und zur Entfernung etwa beigemischter Benzoësäure nochmals mit Aether digerirten Krystalle. Derselbe lag zwischen 140 und 143°. Als qualitative Reactionen sind ferner zu benutzen: 1. der Stickstoffgehalt, 2. die charakteristische Rothfärbung beim Erhitzen, wie bei der Hippursäure und der dabei auftretende aromatische Geruch.

Nachfolgende Tabelle enthält die bei der Verfütterung der Fäulnissäuren erhaltenen Hippursäure-Mengen und die daraus berechneten Quantitäten Hydrozimmtsäure.

Nummer des Versuches	Eiweiss-Material.	Dauer der Fäulniss in Tagen.	In Lösung gegangenes Eiweiss. gr.	Hippursäure aus dem N-Gehalt des Aethereextractes berechnet.		Hydrozimmtsäure aus dem N-Gehalt des Aetherausuges berechnet.	
				gr.	% des zersetzten Eiweiss.	gr.	% des zersetzten Eiweiss.
I.	Fibrin.	4	452,2	6,088	1,35	5,100	1,12
III.	Fibrin.	9	1973,6	30,894	1,56	25,897	1,31
IV.	Fibrin.	13	386,7	6,375	1,65	5,342	1,38
Vb.	Fibrin.	22	401,6	7,160	1,78	6,00	1,49
V.	Fibrin.	26	497,7	6,272	1,58	5,25	1,32
Va.	Fibrin.	38	488,5	5,722	1,17	4,794	0,98
XII.	Fleisch.	11	370	8,266	2,23	6,480	1,75
XXII.	Pankreas-pepton.	12	1058,8	12,9331	1,22	10,838	1,02

1) In diesem Falle ist nicht die Hälfte, sondern nur ein Zehntel der Säuren zum Fütterungsversuch verwendet, in Versuch XXII ein Viertel.

Die Quantität der aus dem Fibrin erhaltenen Hippursäure bewegt sich demnach in der Mehrzahl der Fälle zwischen 1,58 und 1,78 %. Erheblich geringer ist sie nur bei dem kurzdauernden Versuch I, nämlich 1,35 %, und dem Versuch von 38 Tagen Dauer = 1,17 %. Im ersteren Fall lässt sich die geringere Ausbeute ungezwungen von der unvollständig erfolgten Spaltung des Eiweiss ableiten und steht in Uebereinstimmung mit der geringeren Ausbeute an Indol. Ob man aus dem geringeren Werthe bei dem Versuch von 38tägiger Dauer eine Abnahme der einmal gebildeten Säure ableiten darf, wage ich nicht zu entscheiden, um so weniger, als nicht abzusehen ist, welchen Veränderungen die einmal abgespaltene Hydrozimmtsäure resp. Phenyllessigsäure unterliegen soll. Etwas mehr Hippursäure, wie durchschnittlich das Fibrin, lieferte das Fleisch in einem Versuch. Die Quantität der aus dem Pankreaspepton erhaltenen Hippursäure ist merklich geringer, wie die aus dem Fibrin selbst darstellbare.

Zur Controlle wurde in einem Falle die Hippursäure und Phenacetursäure mit möglichster Genauigkeit direct bestimmt. $\frac{8}{10}$ des Auszuges aus dem Fütterungsversuch bei Verwendung der Säure aus Versuch V^a lieferte direct mit Salzsäure gefällt 2,051 gr. Dieses giebt auf's Ganze berechnet $\left(\times \frac{20}{8}\right)$ 5,127 gr. Im Aetherextract wurde Phenacetursäure erhalten 0,181 gr., also auf's Ganze berechnet 0,452 gr. Eine kleine, gleichfalls in den Aetherauszug übergegangene Quantität Hippursäure entging der Bestimmung. Rechnet man die Phenacetursäure auf Hippursäure um (= 0,435 gr.), so ergibt sich als Säure 5,562 gr., was mit der aus dem Stickstoffgehalt des Aetherextractes abgeleiteten Zahl 5,722 gr. sehr nahe übereinstimmt.

Was die Quantität der neben der Hippursäure in dem Fütterungsharn enthaltenen Phenacetursäure betrifft, so ist den Zahlen aus den erörterten Gründen kein hoher Werth beizumessen, indessen geben sie immerhin eine Vorstellung. In der folgenden Tabelle ist die aus der N-Bestimmung

des Aetherextractes berechnete Hippursäure (Summe beider Säuren, ausgedrückt als Hippursäure) und die Phenacetursäure zusammengestellt.

Nummer des Versuches.	Eiweissmaterial.	Dauer der Fäulniss in Tagen.	Hippur-säure. gr.	Phenacetur-säure. gr.
I.	Fibrin	4	6,088	0
III.	Fibrin.	9	30,894	2,233
IV.	Fibrin.	13	6,375	0,175
Vb.	Fibrin.	22	7,160	} Minimale Quantität.
V.	Fibrin.	26	6,272	
Va.	Fibrin.	38	5,722	0,427
XII.	Fleisch.	11	8,266	0,932
XXII.	Pankreaspepton.	12	12,933	2,808

In allen Versuchen bis auf einen von nur 4-tägiger Dauer war also die Hydrozimmtsäure von etwas Phenyllessigsäure begleitet, deren relative Menge keine Gesetzmässigkeit erkennen lässt. — Abweichend von diesem Ergebniss hatten drei frühere Versuche mit Serumalbumin nur Phenyllessigsäure ergeben. Es erschien wünschenswerth, durch einen erneuten Versuch festzustellen, ob aus diesem Material in der That keine Hydrozimmtsäure entsteht. Da möglicherweise die lange Dauer der Fäulniss in den erwähnten Versuchen von Einfluss war, so wurde bei einem neuen Versuche mit Serumalbumin die Fäulniss schon am fünften Tage unterbrochen. Die Verfütterung der hieraus erhaltenen flüchtigen Säuren ergab überwiegend Hippursäure. Endlich sind noch in 3 Fäulnissversuchen mit Fleisch beide Säuren constatirt. Man kann demnach wohl den Satz aufstellen: Die Fäulniss der Eiweisskörper liefert der Regel nach Hydrozimmtsäure mit wechselnden Mengen Phenyllessigsäure. Bei sehr langer Dauer der Fäulniss kann letztere überwiegen (nach 3 Versuchen mit Serumalbumin), bei sehr kurzer Dauer vielleicht fehlen,

IV. Ueber den Modus der Entstehung der Benzoësäure-Homologen bei der Fäulniss.

Durch die Analogie geleitet, sprach zuerst Tiemann¹⁾ die Vermuthung aus, dass die Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure, ebenso, wie die flüchtigen fetten Säuren aus Amidosäuren der Fettreihe, aus im Eiweiss präformirten Phenylamidosäuren hervorgehen möchten. Diese Vermuthung, welche mit der von verschiedenen Autoren²⁾ nachgewiesenen Bildung von Benzoësäure bei der Oxydation von Eiweiss in bestem Einklang stand, erhielt eine festere Unterlage, als E. Schulze und Barbieri³⁾ die Phenylamidopropionsäure unter den Spaltungsproducten des Pflanzen-Eiweiss auffanden.

In der That erhielt kurze Zeit darauf Baumann⁴⁾ durch Fäulnisszersetzung aus 0,5 Gramm, von Schulze selbst dargestellter, Phenylamidopropionsäure Phenyllessigsäure als Spaltungsproduct. Inzwischen hatten wir⁵⁾ Beobachtungen gemacht, welche die allgemeine Gültigkeit dieser Angabe, d. h. die ausschliessliche Entstehung der nicht hydroxyilirten Säuren aus präformirter Phenylamidopropionsäure zweifelhaft machten, vor Allem die Beobachtung, dass reines Tyrosin bei der Fäulniss auch Hydrozimmersäure lieferte (20 gr. Tyrosin gaben 1,2 gr. reine Hydrozimmersäure).

Dem entgegen konnte Baumann⁶⁾ in der Mutterlauge, welche aus der Fäulniss von 100 gr. Tyrosin stammte, keine der beiden flüchtigen aromatischen Säuren auffinden und erklärte es demnach für nicht ausgeschlossen, dass das zu unseren Versuchen benutzte Tyrosin mit Phenylamidopropionsäure verunreinigt gewesen sein könne. Dies ist aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich. Wollte man die Phenylpropionsäure, die wir erhalten haben, aus beigemischter Phenyl-

1) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XIII, S. 385.

2) Guckelberger, Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. LXIV, S. 39. — Städeler, Journal für practische Chemie, Bd. 72, S. 251.

3) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XIV, S. 1785.

4) Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 282.

5) Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 450.

6) Ebendas., Bd. VII, S. 533.

amidopropionsäure ableiten, so müsste man eine recht erhebliche Beimischung dieser Säure annehmen. Dem entgegen erschien das Tyrosin, das wir zu unseren Versuchen verwendet haben und von dem sich eine Quantität von etwa 1.2 gr. noch in unseren Händen befindet, vollkommen rein und homogen, es ist aus heissem Wasser umkrystallisirt, wobei die weit löslichere Phenylamidopropionsäure sicher in Lösung geblieben wäre, und es giebt endlich mit Kaliumchromat und Schwefelsäure erhitzt durchaus keinen Benzaldehydgeruch. Wir halten demnach die Erklärung von Baumann für ausgeschlossen. Was noch mehr gegen die Richtigkeit derselben spricht, ist der Umstand, dass in einem weiteren Fäulnisversuch aus demselben Tyrosin keine Phenylpropionsäure oder Phenyllessigsäure erhalten wurde, was offenbar der Fall sein müsste, wenn dieselbe aus Phenylamidopropionsäure stammte. Es gelingt, wie es scheint, nicht in jedem Fall, den Reductionsvorgang einzuleiten.

Nach alledem müssen wir daran festhalten, dass auch aus reinem Tyrosin nicht-hydroxylierte Säuren entstehen können. Allein wir meinen keineswegs, dass diese Quelle die einzige sei. In der erwähnten Abhandlung sagen wir l. c. S. 452 wörtlich: «natürlich wollen wir nicht in Abrede stellen, dass ein Theil der nicht hydroxylierten aromatischen Säuren auch aus Phenylamidosauren hervorgehen kann». Die Polemik Schotten's²⁾ gegen unsere angebliche Meinung ist somit gegenstandslos. Sie hätte nur dann Berechtigung, wenn wir uns für die ausschliessliche Entstehung dieser Säuren aus Tyrosin ausgesprochen hätten. Dies nimmt Schotten auch an, allein, wie aus dem Obigen³⁾ hervorgeht, durchaus irrthümlicherweise. — Allerdings bleibt die Frage bestehen, wie gross der Antheil geschätzt werden soll, den die eine und den die andere Quelle auf die Entstehung der Säuren hat. In der That scheint es,

1) Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 450.

2) Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 61.

3) Diese Stelle ist die einzige, an der wir die Frage berührt haben.

class wir den Antheil des Tyrosins daran überschätzt, den des nicht hydroxylierten aromatischen Atomcomplex im Eiweiss unterschätzt haben. Unsere Anschauung beruhte neben dem Befund der Hydrozimmtsäure aus Tyrosin sehr wesentlich auch darauf, dass dasjenige Eiweiss, welches durch Trypsinwirkung wenigstens von einem Theile seines Tyrosins befreit war, anscheinend sehr wenig flüchtige aromatische Säuren gab. Der obige Versuch Nr. XXII, der nach Auffindung besserer Methoden zur Bestimmung der Menge der aromatischen Säuren angestellt ist, zeigt nun aber, dass dieses Eiweiss merklich, aber nicht sehr erheblich weniger aromatische Säure liefert, wie das Fibrin selbst. Ich neige mich also jetzt der Anschauung zu, dass im Eiweiss präformirte Phenylamidosäure-Gruppen einen grösseren Antheil an den durch Spaltung entstehenden flüchtigen aromatischen Säuren haben, wie das Tyrosin, um so mehr, seit E. Schulze¹⁾ auch aus Casein und Leim Phenylamidopropionsäure wenigstens mit Wahrscheinlichkeit erhalten hat. Eine weitere wichtige Stütze für die Annahme nicht hydroxylierter aromatischer (Säure-) Gruppen im Eiweissmolecül liegt offenbar in den neuen Beobachtungen von Nencki und Sieber²⁾ über die Bildung beträchtlicher Quantitäten Paranitrobenzoësäure bei Behandlung von trockenem Eiweiss mit Salpetersäure.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 121.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XVIII, S. 394.