

**Ueber die Beziehung einiger, in dem Harn bereits vorgebildeten,
oder daraus durch einfache Proceduren darstellbaren Farbstoffe
zu den Huminsubstanzen.**

Von

Dr. Ladislaus v. Udránszky.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium in Strassburg i. E.)
(Der Redaction zugegangen am 1. August 1887.)

(Fortsetzung.)

Es drängen sich nun zunächst die zwei Fragen auf:

1. Ist man nach der Elementaranalyse und Prüfung der beim Schmelzen mit Aetzkali gewonnenen Zersetzungsproducte berechtigt, die aus dem Harn durch Kochen mit Salzsäure gewonnenen gefärbten Substanzen in irgend eine Gruppe von chemischen Körpern einzureihen?

2. Welcher, oder welche Bestandtheile des normalen Harnes können bei ihrer Zersetzung diese Substanzen liefern?

Entstehungsweise, physikalische Eigenschaften, Zersetzungsproducte und theilweise auch die procentische Zusammensetzung sprechen dafür, dass wir es mit Huminsubstanzen zu thun haben, speciell mit solchen, welche aus Kohlehydraten unter der Einwirkung von Mineralsäuren entstehen.

Unter «Humin» wurden früher und auch in der neueren Zeit von manchen Autoren verschiedene, nicht genau characterisirte, amorphe, schwarzbraune Substanzen von der verschiedensten Herkunft verstanden, welche — wie man glaubte — der weiteren Untersuchung unzugänglich wären. Neuere

Forschungen scheinen zu ergeben, dass man den Ausdruck «Huminsubstanzen» in dem gegebenen Sinne nur für gewisse Körper anwenden darf.

Polydore Boullay und kurz darauf Malaguti¹⁾ waren die Ersten, die die Einwirkung von Mineralsäuren auf Kohlehydrate genauer studirten und die dabei gewonnenen Huminsubstanzen beschrieben. Auch haben die Untersuchungen von Stein²⁾ und Mulder³⁾ über diesen Gegenstand verschiedene interessante Thatsachen zu Tage gefördert, doch wurden diese Arbeiten wenig beachtet, bis Tollens⁴⁾ die Sache wieder in Angriff nahm. Es folgten dann mehrere Veröffentlichungen von Fausto Sessini⁵⁾, Conrad und Guthzeit⁶⁾, und es bestätigte sich immer mehr, dass die Huminsubstanzen, wenn sie auch ihrer wechselnden procentischen Zusammensetzung wegen nicht als einheitliche chemische Körper, sondern vielleicht nur als Agglomerate von verschiedenen Substanzen anzusehen sind, doch eine Gruppe zusammengehöriger Körper mit charakteristischen Eigenschaften darstellen.

Conrad und Guthzeit haben für die aus Kohlehydraten gewonnenen Huminsubstanzen festgestellt, dass die Ausbeute bei Anwendung von Salzsäure eine weit grössere ist, als wenn man Schwefelsäure zu ihrer Abtrennung benützt, dass die Grösse der Ausbeute mit der Concentration der angewendeten Säure Hand in Hand geht, und ferner, dass die Schwankung in der procentischen Zusammensetzung, welche zwischen 62,3—66,5% Kohlenstoff und 3,7—4,6% Wasserstoff variirt, davon abzuhängen scheint, dass concentrirte Säuren Huminsubstanzen mit höherem Kohlenstoffgehalt erzeugen.

1) Annalen der Pharmacie, Bd. XVII, S. 52.

2) Annalen der Pharmacie, Bd. XXX, S. 84.

3) Erdmann's Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XXI, S. 203.

4) Berichte d. d. chem. Gesellsch., Bd. VI, S. 1390.

5) Gaz. chim., Bd. X, S. 121 u. 240. Im Referate in den Berichten d. d. chem. Gesellsch., Bd. XIII, S. 1877.

6) Berichte d. d. chem. Gesellsch., Bd. XIX, S. 2844.

Herr Prof. Hoppe-Seyler war so freundlich, meine Aufmerksamkeit darauf zu lenken, ob die aus dem Harne durch Kochen mit Salzsäure abgetrennten gefärbten Zersetzungsproducte beim Schmelzen mit Aetzkali Protocatechusäure liefern. Er erlaubte mir zugleich, aus seinen noch nicht publicirten Untersuchungen Folgendes mitzutheilen:

«Die Huminsubstanzen der verschiedensten Herkunft: aus Kohlehydraten, Phenolen, Humus, Torf, Braunkohle, soweit bis jetzt die Untersuchungen reichen, haben zusammengehörig mit den Phlobaphenen das übereinstimmende Verhalten ergeben, dass sie beim Schmelzen mit Aetzkali bis über 200° C. Protocatechusäure liefern neben fetten flüchtigen Säuren und einer stickstofffreien Säure, die nicht flüchtig ist, deren Salze beim Erhitzen bereits unter der Glühhitze in sehr charakteristischer Weise unter Bildung hauptsächlich gasförmiger Producte zerfallen, und deren Untersuchung noch weiter geführt werden soll.»

Die aus dem Harne durch anhaltendes Kochen mit Salzsäure abgetrennten gefärbten Substanzen hatten auch diese Eigenschaften; ich erhielt bei der Einwirkung von schmelzendem Aetzkali auf dieselben ebenfalls Protocatechusäure und einen stickstofffreien Rest, welcher die Eigenschaften einer Säure zeigte.

Da nun kein Zweifel mehr oblag, dass die freiwillige Ausscheidung in den genügend lange mit Salzsäure gekochten Harnen aus Huminsubstanzen bestand, wollte ich mich davon überzeugen, ob derjenige Körper, welcher schliesslich noch in Lösung bleibt und welchen ich durch phosphorsaures Natron aus der Lösung entfernt hatte, auch hierher gehört, oder vielleicht andere Characterere besitzt.

Weiter oben war schon erwähnt, dass es nicht gelang, diesen Niederschlag in der Weise zu zerlegen, dass man daraus die gefärbte Substanz rein und vollständig hätte gewinnen können; die Bildung der Protocatechusäure beim Schmelzen

mit Aetzkali gab mir aber eine Reaction an die Hand, mit welcher die Frage gelöst werden konnte. Ich führte deshalb mit dem möglichst gereinigten, getrockneten und pulverisirten Niederschlage in der oben geschilderten Weise das Schmelzen aus und konnte thatsächlich dann im Aetherextract der schwefelsauren Lösung des Schmelzrückstandes mit den bekannten Reactionen Protocatechusäure nachweisen.

Es muss demnach angenommen werden, dass nach Abtrennung der freiwillig ausgeschiedenen Huminsubstanzen aus dem mit Salzsäure gekochten Harn doch ein Rest von Huminsubstanzen in Lösung bleibt und die kirschrothe Färbung hervorruft. Die Huminsubstanzen sind zwar in sauren Flüssigkeiten nur sehr schwer löslich, doch kann es sehr wohl sein, dass der starke Salzgehalt des eingengten Harnes eine Veränderung der Löslichkeitsverhältnisse bedingt.

Die Beantwortung der zweiten Frage: aus welchem Harnbestandtheile diese Huminsubstanzen entstehen können, war viel schwieriger und umständlicher. Gegen die naheliegende Annahme, dass dieselben aus den Kohlehydratbestandtheilen des Harns stammen, schien der Umstand zu sprechen, dass die Elementaranalyse einen wenn auch schwankenden, doch immerhin bedeutenden Stickstoffgehalt ergab und alle Zeichen darauf hinwiesen, dass der Stickstoff nicht nur lose angefügt, sondern wahrscheinlich in das Molecül eingetreten war, was auch daraus hervorging, dass es nur durch so bedeutende Eingriffe, wie das Schmelzen mit Aetzkali, gelang, den Stickstoff in der Form von Ammoniak zu entfernen. Ein anderer Bestandtheil des normalen Harns aber, welcher so bedeutende Mengen von Huminsubstanzen, wie ich sie gefunden, unter der Einwirkung von Mineralsäuren liefern könnte, ist nicht bekannt.

Um nun zu entscheiden, ob nicht doch die reducirende Substanz des Harnes als die Muttersubstanz der Huminverbindungen anzusehen sei, bestimmte ich das Reductionsvermögen des Harnes vor und nach dem Kochen mit Salzsäure nach der von M. Flückiger¹⁾ angegebenen Methode.

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. IX, S. 323.

Derselbe Autor hat auch die Einwirkung von Schwefelsäure auf die reducirende Substanz des normalen Urins geprüft. Er fand, dass, wenn man 50 ccm. Harn mit 5 ccm. 25procentiger Schwefelsäure 20 Minuten lang kocht, dann mit Natriumcarbonat neutralisirt, auf das ursprüngliche Volumen bringt und wieder titirt, in einem Drittel der Fälle eine Zunahme der Reductionsfähigkeit des Harnes um 10—20% constatirt werden kann.

Meine Untersuchungen in dieser Richtung ergaben, dass bei dem anhaltenden Kochen des Harnes mit Salzsäure, welches ich zur vollständigen Ausscheidung der Huminsubstanzen für nöthig fand, die reducirende Substanz vollständig zerstört wird. Die Bestimmungen wurden so ausgeführt, dass ich den Harn, in welchem die Reductionsfähigkeit vorher bestimmt wurde, nach 18stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler von den ausgeschiedenen Huminsubstanzen abfiltrirte, das kirschrothe Filtrat mit Thierkohle entfärbte, mit Kalilauge neutralisirte, dann mit einigen Tropfen Essigsäure schwach ansäuerte, auf das ursprüngliche Volumen brachte und nach Flückiger's Angaben mit Fehling'scher Lösung titirte. Bei wiederholten Versuchen fand ich immer genau übereinstimmend, dass 20 ccm. des entfärbten Urins, 80 ccm. Wasser und 20 ccm. Fehling'scher Lösung den Zusatz von 20 ccm. 0,5procentiger Traubenzuckerlösung zur vollständigen Reduction des Kupferoxyds erforderten, mit anderen Worten: der Harn hatte also sein Reductionsvermögen vollkommen eingebüsst.

Dass bei dieser Procedur nicht nur die Salzsäure, sondern auch das lange Erhitzen bei der Zerstörung der reducirenden Substanz des normalen Urins betheilig ist, — ist um so mehr anzunehmen, da Flückiger's Versuche bereits erwiesen haben, dass nach Eindampfen des Harns bei hoher Temperatur die Reductionsfähigkeit um $\frac{5}{6}$ geringer wird.

Da nach dem angegebenen Verhalten der reducirenden Substanz im normalen Urin ein Zusammenhang zwischen ihr und den durch Kochen mit Salzsäure gewonnenen Huminsubstanzen noch mehr an Wahrscheinlichkeit gewonnen hat,

so wollte ich untersuchen, ob nicht vielleicht die Ausbeute an Huminsubstanzen zu der Grösse der Reductionsfähigkeit in einem bestimmten Verhältniss steht. Ich habe zu diesem Zwecke fünf quantitative Bestimmungen ausgeführt, welche in dieser Arbeit schon einmal erwähnt wurden, die ich jetzt aber ausführlicher nochmals angeben möchte:

I. Bestimmung.

10 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,155procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 18stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 2,3147 gr., also 0,0231%.

Verhältniss der Reductionsfähigkeit zur Ausbeute = 100 : 14,93.

II. Bestimmung.

9,5 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,215procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 24stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 2,8953 gr., also 0,0304%.

Verhältniss der Reductionsfähigkeit zur Ausbeute = 100 : 14,16.

III. Bestimmung.

11 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,232procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 26stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 3,6720 gr., also 0,0333%.

Verhältniss der Reductionsfähigkeit zur Ausbeute = 100 : 14,35.

IV. Bestimmung.

8 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,192procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 18stündigem Kochen mit 10 Vol.-%

Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 2,1784 gr., also 0,0272%.

Verhältniss der Reductionsfähigkeit zur Ausbeute = 100 : 14,14.

V. Bestimmung.

13 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,207 procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 25stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 3,8132 gr., also 0,0293%.

Verhältniss der Reductionsfähigkeit zur Ausbeute = 100 : 14,13.

In allen fünf Bestimmungen war nach der Abtrennung der Huminsubstanzen in dem Filtrate keine Reduction mehr nachzuweisen.

Bei der ersten Besprechung dieser Bestimmungen habe ich bereits erwähnt, dass durch 18stündiges Kochen das Maximum der Ausbeute an Huminsubstanzen zu erreichen ist, und dass der scheinbare Einfluss von noch längerem Kochen auf die Grösse der Ausbeute nur als ein Zufall betrachtet werden muss: die Ausbeute an Huminsubstanzen steht in einem constanten Verhältniss zur Reductionsfähigkeit des Harnes (ungefähr 1 : 7). In allen Fällen, wo die Reductionsfähigkeit des Harnes nach der von Flückiger angegebenen Methode bestimmt wurde, fand ich die Ausbeute an Huminsubstanzen um so bedeutender, je weniger 0,5 procentige Traubenzuckerlösung zu der abgemessenen Harnmenge zugesetzt werden musste, um eine bestimmte Portion Fehling'scher Lösung genau zu reduciren.

Flückiger gibt an, dass eine Verminderung des Reductionsvermögens um $\frac{1}{6}$ des ursprünglichen zu constatiren ist, wenn der normale Harn bei 60° C. eingedampft wird, also bei einer Temperatur, welche ich ebenfalls benützte, um den Harn auf $\frac{1}{6}$ Volum einzuengen. Ich glaube aber kaum, dass diese Abnahme der Reductionsfähigkeit des Harnes eine

Verminderung der Ausbeute an Huminsubstanzen zur Folge hatte. Es ist vielmehr anzunehmen, dass während des Eindampfens bereits die Bildung von Huminsubstanzen eingeleitet wird; das Dunkelwerden des Harns bei der Einengung, welches nicht allein durch die Concentration bedingt sein kann, spricht dafür. Die Menge der entstandenen Huminkörper ist aber so gering, dass sie nicht zur Ausscheidung kommen.

Es wurde schon erwähnt, dass der eingeengte Harn, mit 10 Vol.-% Salzsäure gemischt, nach 48 Stunden stets eine recht dunkle, meistens mahagonibraune Färbung zeigte. In einer bei 60° C. etwas eingedampften Traubenzuckerlösung konnte ich durch dieselbe Behandlung nie eine so intensive Verdunkelung bereits in der Kälte erzielen. Es muss daher angenommen werden, dass ausser der reducirenden Substanz noch andere Harnbestandtheile unter dem Einflusse von Salzsäure in der Kälte bereits dunkelgefärbte Spaltungsproducte liefern.

In erster Linie kommen da die Indoxylverbindungen in Betracht. Baumann und Brieger¹⁾ haben schon angegeben, dass das indoxylschwefelsaure Kalium durch Salzsäure in ein schwefelsaures Salz und einen braunen, in Wasser unlöslichen Körper gespalten wird. Dieser braune Niederschlag kann auch Spuren von Indigoblau enthalten, doch lässt sich dieses erst dann in grösserer Menge gewinnen, wenn man neben der Salzsäure auch noch schwach oxydirende Substanzen auf die Indoxylverbindungen einwirken lässt. Erhitzt man indoxylschwefelsaures Kalium in neutraler wässriger Lösung auf 120—130° C., so tritt vollständige Zersetzung ein, und es entsteht neben Indigoblau wieder eine ähnliche braune Substanz, wie bei der Behandlung mit Salzsäure.

Die Untersuchung, ob dieser braune Körper auch vielleicht eine Huminsubstanz sei, wäre bei der geringen Menge der Indoxylverbindungen im Harne mit zu grossen Schwierigkeiten verbunden gewesen. Ich wollte mich nur darüber

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. III, S. 254.

orientiren, ob die Indoxylverbindungen im Harn einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute an Huminsubstanzen haben.

Zu diesem Zwecke führte ich mit zwei Portionen desselben Harnes zwei vergleichende Bestimmungen aus. In der ersten Portion wurden die Huminsubstanzen nach der oben schon angegebenen Methode abgetrennt, in der zweiten habe ich den eingeeengten Harn nach Zusatz von 10 Vol.-% Salzsäure und 48stündigem Stehen an der Luft, mit Aether so lange ausgeschüttelt, als noch etwas in ihn überging, den Harn dann am Wasserbade 2 Stunden lang unter fleissiger Umrührung gekocht, nach dem Erkalten wieder mit Aether extrahirt, nachher den Verlust durch die Verdunstung mit destillirtem Wasser ersetzt und erst dann am Rückflusskühler 18 Stunden lang weiter gekocht. Beide Aetherauszüge hatten eine schön violette Farbe; es war also anzunehmen, dass beträchtliche Mengen von Indigoblau nebst anderen Indigoverbindungen aus dem Harn entfernt worden waren.

I. Bestimmung.

5 Liter Harn, welcher ein ebenso grosses Reductionsvermögen zeigte, wie eine 0,22procentige Traubenzuckerlösung, lieferten nach 18stündigem Kochen mit 10 Vol.-% Salzsäure am Rückflusskühler eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 1,5822 gr., also 0,0316%.

II. Bestimmung.

5 Liter desselben Urins, auf $\frac{1}{6}$ eingeeengt, mit 10 Vol.-% Salzsäure 48 Stunden stehen gelassen, mit Aether mehrmals ausgeschüttelt, nachher 2 Stunden am Wasserbade gekocht, nach dem Erkalten wieder mit Aether behandelt und dann 18 Stunden am Rückflusskühler weiter gekocht, lieferten eine Ausbeute an Huminsubstanzen von 1,5286 gr., also 0,0305%.

Die Differenz in der Ausbeute ist eine so geringe, dass es nach diesen zwei Bestimmungen gewagt wäre, den Schluss ziehen zu wollen, dass die Indoxylverbindungen im Harn einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute an Huminsub-

stanzen haben. Ich bin daher gezwungen anzunehmen, dass die Bildung von Huminsubstanzen im Harn beim anhaltenden Kochen mit Salzsäure hauptsächlich durch die Zersetzung der reducirenden Substanz bedingt ist.

Mit dieser Annahme scheint nur — wie schon erwähnt — die Thatsache nicht recht vereinbar, dass die aus dem Urin abgetrennten Huminsubstanzen einen beträchtlichen Stickstoffgehalt zeigten. Wenn es auch nach Flückiger¹⁾ nicht unwahrscheinlich ist, dass die reducirende Substanz des normalen Harns wenigstens zum grössten Theil eine mit einem stickstoffhaltigen Stoffwechselproduct verbundene Glyceuronsäure darstellt, so muss man doch annehmen, dass dieses complexe Molecül unter der Einwirkung von Säure und Wärme zunächst gespalten wird, und dass nur der stickstofffreie Bestandtheil Huminsubstanzen liefert. Der Stickstoff kann also nur während der Bildung der Huminsubstanzen in das Molecül aufgenommen sein.

Es lag am nächsten, daran zu denken, dass es das beim Kochen des Harns mit Salzsäure sich bildende Ammoniak ist, welches in statu nascendi in die Huminverbindung eintritt und den Stickstoffgehalt desselben bedingt. Ich fand aber in der Literatur gar keine Angaben darüber, ob Huminsubstanzen mit Ammoniak solche Verbindungen einzugehen vermögen, in welchen der Stickstoff nicht nur lose angefügt ist, sondern in festerem Zusammenhange sich befindet, wie das von den aus dem Harn abgetrennten Huminsubstanzen wegen ihres Verhaltens gegen chemische Proceduren anzunehmen war.

Um über diese Frage in's Klare zu kommen, habe ich 20 gr. Traubenzucker und 5 gr. Harnstoff in 500 gr. Wasser gelöst, mit 10 Vol.-% Salzsäure 18 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Ich gewann auf diese Weise eine bedeutende Quantität von Huminsubstanzen, welche dieselben physikalischen Eigenschaften, dasselbe Verhalten gegen Lösungs-

1) L. c., S. 350.

mittel zeigten, wie die aus dem Harn dargestellten. Nach wiederholtem Auflösen in Natronlauge, Fällern mit Schwefelsäure und Trocknen lieferten sie beim Erhitzen mit Natronkalk beträchtliche Mengen von Ammoniak. Die Elementaranalyse ergab folgende Werthe:

a) 0,2273 gr. lieferten 0,4804 gr. Kohlensäure, 0,0810 gr. Wasser und 0,0003 gr. Asche.

b) 0,5039 gr. lieferten 32 chem. Stickstoffgas, bei 756 mm. Luftdruck, 28,8° C. und 414 mm. Höhe der Wassersäule im Absorptionsrohr.

C 57,79%,

H 3,96%,

N 6,73%.

Es wurden dann auch die Zersetzungsproducte beim Schmelzen mit Aetzkali untersucht. Ich gewann durch diese Procedur: Ammoniak, Oxalsäure, Ameisensäure und höhere Fettsäuren, die weiter von einander nicht getrennt wurden, Protocatechusäure, Brenzcatechin und einen stickstofffreien Rest, welcher ebenfalls der Elementaranalyse unterworfen wurde.

0,1754 gr. lieferten 0,3988 gr. Kohlensäure, 0,0643 gr. Wasser und 0,0022 gr. Asche.

C 62,79%,

H 4,12%.

Nachdem es mir somit in der That gelungen war, aus einem Kohlehydrat, bei Gegenwart von Ammoniak im Entstehungszustande, stickstoffhaltige Huminsubstanzen darzustellen, wollte ich noch untersuchen, ob bei wechselnder Menge des Ammoniaks auch der Stickstoffgehalt der Huminsubstanzen ab- und zunimmt, oder ob die Schwankung desselben nur eine ganz zufällige ist.

Ich habe deshalb 20 gr. Traubenzucker und 20 gr. Harnstoff in 500 gr. Wasser gelöst, wieder mit 10 Vol.-% Salzsäure 18 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Huminsubstanzen wurden in der bereits geschilderten Weise gereinigt und dann auf ihre procentische Zusammensetzung geprüft.

- a) 0,2047 gr. lieferten 0,3992 gr. Kohlensäure, 0,0795 gr. Wasser und 0,0014 gr. Asche.
- b) 0,4145 gr. lieferten 55 cbem. Stickstoffgas, bei 753 mm. Luftdruck, 33° C. und 274 mm. Höhe der Wassersäule im Absorptionsrohr.

C	53,55%
H	4,34%
N	13,61%

Aus der Vergleichung der Elementaranalyse dieser zwei verschiedenen, aus Traubenzucker und Harnstoff durch Synthese gewonnenen Präparate geht hervor, dass die Huminsubstanzen im Momente der Bildung nach der Quantität des gegenwärtigen Ammoniak verschiedene Mengen desselben aufzunehmen im Stande sind, und dass daher ihr Stickstoffgehalt als ein zufälliger, unwesentlicher betrachtet werden muss.

Wenn man die procentische Zusammensetzung der aus Traubenzucker und Harnstoff dargestellten Huminsubstanzen mit der der aus dem Harn gewonnenen vergleicht, so ergibt sich eine sehr deutliche Aehnlichkeit zwischen denselben. Dass sie einander wirklich nahe stehen, wird um so einleuchtender, wenn man von dem Stickstoffgehalte absieht: doch möchte ich diese tabellarische Zusammenstellung erst später folgen lassen.

Es soll vorher noch über die Untersuchungen berichtet werden, welche ich mit diabetischen Harnen ausgeführt habe, um — so zu sagen — ein Zwischenglied zwischen den aus Harnstoff und Traubenzucker dargestellten und den aus normalem Urin gewonnenen Huminsubstanzen zu finden. Der hierzu benützte Harn war eiweissfrei und stammte von einem Kranken her, bei welchem es sehr leicht gelang, durch animalische Kost den Zucker aus dem Urin verschwinden zu machen, und ebenso leicht, durch Darreichung von nur wenig Amylaceen die Zuckerausscheidung hervorzurufen.

Dieser Harn wurde ebenso behandelt wie der normale, nur war es nicht nothwendig, denselben am Rückflusskühler

so lange zu kochen, denn schon nach 10stündigem Erhitzen waren immer so bedeutende Mengen von Huminsubstanzen ausgeschieden, dass die ganze Flüssigkeit eine breiige Consistenz bekommen hatte.

I. Bestimmung.

3,45 Liter Harn, mit 4,4% Zuckergehalt, auf $\frac{1}{3}$ eingengt, mit 10 Vol.-% Salzsäure 10 Stunden am Rückflusskühler gekocht, lieferten eine Ausbeute von 27 gr.

II. Bestimmung.

3 Liter Harn, mit 5,32% Zuckergehalt, auf $\frac{1}{3}$ eingengt, mit 10 Vol.-% Salzsäure 12 Stunden am Rückflusskühler gekocht, lieferten eine Ausbeute von 31 gr.

III. Bestimmung.

2,5 Liter Harn, mit 5,13% Zuckergehalt, auf $\frac{1}{3}$ eingengt, mit 10 Vol.-% Salzsäure 10 Stunden am Rückflusskühler gekocht, lieferten eine Ausbeute von 22 gr.

Leider fehlte es mir an Zeit, durch genauere Bestimmungen festzustellen, wie viel Säure man zusetzen und wie lange man kochen muss, um die grösste Menge von Huminsubstanzen aus diabetischem Harn zu gewinnen. Doch glaube ich, dass die Ausbeute noch wesentlich gesteigert werden kann, da aus reinem Traubenzucker viel bedeutendere Quantitäten von Huminsubstanzen sich gewinnen lassen.

Die ausgeschiedenen Huminsubstanzen wurden ebenso gereinigt, wie die aus dem normalen Urin dargestellten. Die Elementaranalyse ergab folgende Werthe:

- a) 0,2408 gr. lieferten 0,4919 gr. Kohlensäure, 0,0920 gr. Wasser und 0,0002 gr. Asche.
- b) 0,7529 gr. lieferten 66,8 ccm. Stickstoffgas, bei 758 mm. Luftdruck, 21,2° C. und 152 mm. Höhe der Wassersäule im Absorptionsrohr.

C	55,75%
H	4,25%
N	9,96%

Unter dem Einflusse des schmelzenden Kali erhielt ich aus der Substanz: Ammoniak, Oxalsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Valeriansäure, Brenzcatechin, Protocatechusäure und einen stickstofffreien Rückstand, welcher ebenfalls der Elementaranalyse unterworfen wurde.

0,2389 gr. gaben 0,5464 gr. Kohlensäure, 0,0787 gr. Wasser und 0,0025 gr. Asche.

C 63,03%,

H 3,69%.

Ohne irgend welche Schlüsse daraus ziehen zu wollen, möchte ich es bloß als Thatsache aufführen, dass der Harn von demselben Kranken während der animalischen Kost eine geringere Reductionsfähigkeit zeigte, als der Harn gesunder Menschen. Ich hatte 900 ccm. solchen Harnes von dem Diabetiker zur Verfügung. Er enthielt geringe Spuren von Aceton; Oxybuttersäure war in demselben nicht nachzuweisen. 20 ccm. dieses Harnes, 80 ccm. N_2O und 20 ccm. Fehling'scher Lösung erforderten den Zusatz von 15 ccm. 0,5procentiger Traubenzuckerlösung, damit die Reduction des Kupferoxyds vollständig stattfand. Das Reductionsvermögen war also ein so grosses, wie das einer 0,125procentigen Traubenzuckerlösung. 800 ccm. desselben Harnes, auf $\frac{1}{2}$ eingeeengt, mit 10 Vol.-% Salzsäure 18 Stunden am Rückflusskühler gekocht, lieferten 0,1378 gr. Huminsubstanzen, also 0,0172%.

Die Vergleichung der bisher aufgeführten Elementaranalysen lässt recht klar erkennen, dass die stickstofffreien Schmelzrückstände:

der Huminsubstanzen aus normalem Harn, mit 62,26%
Kohlenstoff, 3,9% Wasserstoff,

der Huminsubstanzen aus diabetischem Harn, mit 63,03%
Kohlenstoff, 3,69% Wasserstoff,

der Huminsubstanzen aus Traubenzucker und Harnstoff,
mit 62,79% Kohlenstoff und 4,12% Wasserstoff

in ihrer Zusammensetzung einander nahe stehen.

Dasselbe gilt auch für die Huminsubstanzen selbst:

	C:	H:	N:
Humins. aus normalem Urin, I. Präp.	55,31 %	4,38 %	10,29 %
Humins. aus normalem Urin, II. Präp.	56,32 »	4,16 »	8,44 »
Humins. aus diabetischem Harn	55,75 »	4,25 »	9,96 »
Humins. aus Traubenzucker und Harnstoff, I. Präp.	57,79 »	3,96 »	6,73 »
Humins. aus Traubenzucker und Harnstoff, II. Präp.	53,55 »	4,34 »	13,61 »

Ich glaube weiter oben bewiesen zu haben, dass der Stickstoffgehalt der von mir untersuchten Huminsubstanzen keine wesentliche Bedeutung beanspruchen darf; es ist vielmehr anzunehmen, dass er aus Zersetzungsproducten stickstoffhaltiger Körper, deren Beimengung inconstant ist, hervorgeht. Könnte man aus dem Harn den Stickstoff vollkommen entfernen, ohne die reducirende Substanz zu zerstören, so liessen sich aus derselben wahrscheinlich stickstofffreie Huminsubstanzen gewinnen.

In welcher Form der Stickstoff in ihnen enthalten ist, mag dahingestellt bleiben; um den Vergleich der einzelnen Huminsubstanzen möglich zu machen, habe ich angenommen, dass er in allen als Amid (NH_2) enthalten ist. Bei der Umrechnung der Procentzahlen brachte ich also für den Stickstoff auch das entsprechende Aequivalent Wasserstoff in Abzug.

Die berechneten stickstofffreien Reste gestalten sich folgendermassen:

	C:	H:
Für die Humins. aus normalem Harn, I. Präp.	62,16 %	4,10 %
Für die Humins. aus normalem Harn, II. Präp.	61,91 »	3,91 »
Für die Humins. aus diabetischem Harn	62,40 »	3,96 »
Für die Humins. aus Traubenzucker und Harnstoff, I. Präp.	62,28 »	3,74 »
Für die Humins. aus Traubenzucker und Harnstoff, II. Präp.	62,67 »	3,94 »

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, dass: die aus normalem Harn, aus diabetischem Harn, sowie aus Traubenzucker und Harnstoff durch eine und dieselbe Methode dargestellten Humin-

substanzen die gleichen, oder wenigstens einander nahestehende Körper oder Gruppen zusammengehöriger Substanzen sind.

Um einen weiteren Stützpunkt für die Ansicht zu gewinnen, dass beim Behandeln des Harns mit Mineralsäuren Kohlehydrate zerfallen, untersuchte ich, ob sich neben den Huminsubstanzen noch andere charakteristische Spaltungsproducte der Zuckerarten nachweisen liessen.

Mulder¹⁾ hat bei der Einwirkung von Mineralsäuren auf Zucker, neben den Huminsubstanzen, Ameisensäure und noch zwei andere Säuren gefunden, von welchen er die eine mit der Glucinsäure von Péligot identificirte, die zweite Apoglucinsäure nannte.

Als Tollens²⁾ die Mulder'schen Untersuchungen wiederholte, erhielt er beim Kochen des Rohrzuckers mit Schwefelsäure neben Ameisensäure eine neue Säure, die Lävulinsäure. Conrad³⁾ wies später nach, dass die Lävulinsäure identisch ist mit der β -Acetylpropionsäure. Seitdem ist diese Säure bei der Zersetzung von sehr vielen Kohlehydraten gefunden worden.

Thierfelder⁴⁾ erhielt beim Kochen der Glycuronsäure mit Salzsäure einen Körper mit den Eigenschaften einer Säure, welcher mit der Formel $C_5H_6O_3$ gut stimmende Werthe bei der Elementaranalyse ergab. Sie steht offenbar der Lävulinsäure nahe.

Es war mir also darum zu thun, zu untersuchen, ob im mit Säuren gekochten Harn ausser den Huminsubstanzen auch Lävulinsäure oder eine ihr nahestehende Verbindung auftrete.

Zu diesem Zwecke habe ich den von den Huminsubstanzen abfiltrirten Harn mit dem Waschwasser vereinigt.

1) L. c.

2) L. c.

3) Berichte d. d. chem. Gesellsch., Bd. XI, S. 2177.

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XI, S. 388.

die Säure darin mit kohlensaurem Kalk bis zur ganz schwach sauren Reaction abgestumpft und dann mit grossen Portionen Aether ausgeschüttelt. Der Rückstand des Aetherausuges wurde mit wasserfreiem Aether aufgenommen; er bildete nach dem Abdestilliren eine breiige krystallinische Masse, doch erwies sich bald, dass in der Hauptsache Benzoësäure vorlag. Nach Abtrennung derselben mit Hülfe von Petroläther blieb eine honiggelbe syrupöse Masse zurück, welche selbst nach 3 Wochen unter der Luftpumpe nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte. Sie wurde dann mit Kalkwasser und Kohlensäure behandelt, der kohlensaure Kalk abgetrennt, die Lösung erwärmt, filtrirt, dann etwas eingengt und über Schwefelsäure im Exsiccator stehen gelassen. Nach Verdunsten des Wassers blieb eine gelbe, undeutlich krystallinische Masse zurück. Da ich aber aus 10 Liter Harn nicht mehr als 0,05 gr. dieses zweifelhaften Kalksalzes gewinnen konnte, so musste ich — vorläufig wenigstens — von der weiteren Bearbeitung absehen.

Späteren Untersuchungen muss es vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob bei der Zersetzung des Harns durch Mineralsäuren wirklich Lävulinsäure, oder irgend eine ihr nahe-stehende Säure entsteht.

Wenn nun die Ergebnisse meiner Untersuchungen zusammengefasst werden, so glaube ich, folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. In Harnen, welche mit Mineralsäuren gekocht werden, tritt mit der Dunkelfärbung derselben eine Ausscheidung von Huminsubstanzen auf.

2. Diese Huminsubstanzen entstehen durch die Zersetzung der reducirenden Substanz des normalen Urins, und ihre Quantität steht in constantem Verhältniss zu dem Reductionsvermögen des Harns.

3. Durch wenigstens 18stündiges Kochen des Harns mit Salzsäure ist es möglich, die Humin-

substanzen vollkommen zur Ausscheidung zu bringen. In diesem Falle verliert der Harn seine Reduktionsfähigkeit.

4. Die Indoxylverbindungen haben wahrscheinlich einen nur sehr geringen Einfluss auf die Bildung dieser Huminsubstanzen.

5. Aus Kohlehydraten können bei Gegenwart von Ammoniak in statu nascendi stickstoffhaltige Huminsubstanzen entstehen.

Thudichum spricht sich in seiner bereits citirten Arbeit¹⁾ in folgender Weise aus: «To my mind there is no longer any doubt, that Proust's fallow resin, Scharling's omichmyl-oxyde, Heller's urrhodine or indigored, Schunck's indirubine or indigored from urine, Scherer's colouring matter of urine as subjected by him to elementary analysis, Harley's urohematine, and Marcet's immediate principle, are differend expressions for one and the same mixture of substances, — namely, of some of the products of decomposition by acids or ferments, under the influence of air, time or heat, of a yellow colouring matter contained in the urine.»

Diesen Satz kann ich nach meinen Untersuchungen theilweise auch unterschreiben. Ich glaube, dass es kaum einem Zweifel unterliegt, dass alle diejenigen Farbstoffe, welche man bisher aus normalem Urin durch Säuren, Erhitzen und Oxydation gewann, abgesehen von den Indigoverbindungen und dem Urobilin, unvollständig ausgebildete oder durch Beimengung fremder Stoffe verunreinigte Huminsubstanzen waren. Ich glaube ferner auch, dass Thudichum's Uropittin, Uromelanin und Omicholsäure ebenso aufzufassen sind. Dahin gehören auch Heller's Urophacin und noch andere, aus dem Harn mit Mineralsäuren dargestellte gefärbte Substanzen. Damit werden natürlich alle Bestrebungen hinfällig, aus

¹⁾ D. c., S. 512.

Reactionen, welche auf Einwirkung von Mineralsäuren auf den Harn beruhen, diagnostische Schlüsse ziehen zu wollen.

Ob aber diese aus dem Harn darstellbaren braunen Substanzen von einem gelben Farbstoff, dem supponirten normalen Harnfarbstoff, abzuleiten sind — wie das auch Thudichum annimmt —, dürfte erst dann entschieden werden können, wenn es einmal gelungen ist, die reducirende Substanz des Harns zu isoliren, welche nach meinen Untersuchungen die Muttersubstanz der braunen Huminverbindungen darstellt. Es scheint mir nicht zweifelhaft, dass diese sich als farbloser Körper herausstellen wird. Wodurch ist dann nun aber die gelbe Farbe des frischen Harnes bedingt? Wenn es mir erlaubt ist, eine Vermuthung, welche immerhin einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit beanspruchen dürfte, auszusprechen, so glaube ich, dass die Umwandlung der Kohlehydrate in Huminsubstanzen bereits innerhalb des Körpers beginnt und somit zur gelben Färbung des frisch gelassenen Harnes beiträgt.

Jedenfalls geht aus den mitgetheilten Untersuchungen hervor, dass es nicht nothwendig ist, für die Farbenveränderung des normalen Urins, welche sich unter der Einwirkung von Säuren und in der Wärme vollzieht, ausser den Indoxylverbindungen und dem eventuell ebenfalls gegenwärtigen Hydrobilirubin, noch einen weiteren besonderen Harnfarbstoff — etwa ein Urochrom — anzunehmen und verantwortlich zu machen. Es gelingt nicht in jedem frisch gelassenen Harn, Urobilin nachzuweisen; ganz besonders wären also in derartigen Fällen die Huminsubstanzen als färbendes Princip des Harns mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

II.

Im Anschluss an diese Arbeiten soll noch über die Untersuchungen berichtet werden, welche den Zweck hatten, zu ermitteln, ob nicht vielleicht auch gewisse, in manchen frisch gelassenen Harnen schon bemerkbare, oft recht intensive Dunkelfärbungen mit den Huminsubstanzen in Zusam-

menhang zu bringen wären, ob also nicht vielleicht einige Nahrungs- oder Arzneimittel die Fähigkeit besäßen, nach ihrer Einverleibung in den thierischen Organismus die Bildung von Huminsubstanzen bereits innerhalb des Körpers, und den Uebergang derselben dann in den Urin hervorzurufen.

Es lag am nächsten, den Pflanzenfresserharn in Bearbeitung zu nehmen, welcher — wie bekannt — in jüngstem Alter der Thiere, wo diese sich noch von der Muttermilch ernähren, eine hellgelbe Farbe besitzt. Der Harn bekommt aber sogleich von dem Zeitpunkte an eine dunkle Färbung, wo die Pflanzenfresser anfangen, zu ihrer Ernährung pflanzliche Stoffe, insbesondere aber Gras oder Heu zu sich zu nehmen.

Ebenso ist es bekannt, dass das Blutserum dieser Thiere auch eine eigene bräunliche Färbung zeigt, wie es sich beim Pferdeblut mit Leichtigkeit constatiren lässt; wenn es allerdings von grossem Interesse gewesen wäre, den Nachweis zu liefern, ob dieser bereits im Blute bemerkbare Farbstoff als identisch betrachtet werden könnte mit dem, welcher dem Harne die charakteristische Farbe verleiht, so musste ich mich doch vorläufig darauf beschränken — ohne Rücksicht auf ihre Genese —, die färbende Substanz des Urins zu isoliren und ihre chemische Beschaffenheit festzustellen.

Mancher Vortheile halber, welche der Pferdeharn bietet, benützte ich diesen zu meinen Untersuchungen. Da es daran gelegen war, den Farbstoff womöglich in der Form abzutrennen, in welcher er im Harne enthalten ist, so konnten alle, sonst vielleicht leichter ausführbare Methoden nicht in Betracht kommen, bei welchen eine Zersetzung kaum zu vermeiden ist oder bei welchen auf die Weise, wie es vom Menschenharn beschrieben wurde, Huminsubstanzen sich bilden können, wodurch dann die richtige Beurtheilung der Frage schwieriger wird.

Zur Entfärbung des Urins, respective zur Abtrennung des Farbstoffes aus demselben wurde zuerst eine concentrirte Lösung von Zinnchlorür benützt, und es gelang auch in der That, die Entfärbung in einem Maasse durchzuführen, wie

es mit anderen Mitteln kaum zu erreichen sein dürfte. Diese Manipulation hatte aber einen sehr grossen Nachtheil: es wollte nämlich durchaus nicht gelingen, das Zinnsalz von dem Farbstoffe zu trennen, ohne dabei wesentliche Verluste an dem letzteren zu erfahren.

Es wurde schliesslich folgendes Verfahren eingeschlagen: Der mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn wurde mit neutralem Bleiacetat bis zur völligen Sättigung behandelt. Die Bleiniederschläge wurden am Filter mit kaltem und warmem Wasser gewaschen, dann mit einer concentrirten Natriumcarbonatlösung zerrieben, wobei der Farbstoff in Lösung überging. Diese dunkelbraune Lösung säuerte ich dann mit Essigsäure an und schüttelte sie zur Entfernung der eventuell im Harne vorhandenen und von dem Bleiacetat mitgerissenen Protocatechusäure mit grossen Portionen Aether aus, trennte denselben im Scheidetrichter ab. Die Farbstofflösung wurde dann mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Calciumchlorid bei möglichstem Luftabschluss gefällt. Den entstandenen voluminösen Niederschlag wusch ich am Filter mit ausgekochtem Wasser, mit Alkohol und Aether aus und trocknete ihn über Schwefelsäure im Exsiccator.

Ich befolgte darum dieses etwas langwierige und complicirte Verfahren, weil es nicht gut gelingen wollte, nach der Entbleiung mit Natriumcarbonat den Farbstoff aus der Lösung mit Säure zu fällen. Dies war nur dann möglich, wenn die Flüssigkeit zur schnelleren Entfernung der Kohlensäure am Wasserbade zugleich gekocht wurde.

Der mit Calciumchlorid in der ammoniakalischen Lösung des Farbstoffes gewonnene Niederschlag bildete ein äusserst feines, braunes Pulver, welches in kaltem Wasser, Alkohol, Aether und Ammoniak unlöslich war, sich auch in warmem Wasser und in verdünnten Säuren nur sehr schwer löste. Concentrirte Säuren, besonders concentrirte Salzsäure, lösten es mit Leichtigkeit auf.

Die concentrirten sauren Lösungen zeigten nach einiger Zeit insoferne eine Veränderung, als sich aus denselben

schwarze Flocken ausschieden, welche in Natronlauge löslich und aus derselben mit Schwefelsäure fällbar waren.

Der Kalkniederschlag (oder vielleicht das Kalksalz) des Farbstoffes lieferte beim Erhitzen mit Natronkalk Ammoniak.

Ich wollte mich zunächst davon überzeugen, ob dieser in dem Kalkniederschlage enthaltene Farbstoff dasjenige, nach den oben citirten Untersuchungen des Herrn Prof. Hoppe-Seyler, für die Huminsubstanzen charakteristische Verhalten unter dem Einflusse des schmelzenden Kali zeigt, welches für die gefärbten Substanzen aus dem menschlichen Urin nachzuweisen war.

Nachdem das Schmelzen mit Aetzkali in der angegebenen Weise ausgeführt wurde, konnte ich folgende Zersetzungsproducte constatiren: Ammoniak (in geringer Menge), Oxalsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, und eine höhere Fettsäure oder ein Gemisch höherer Fettsäuren, dessen Baryumsalz den Ba-Gehalt von 23,7% zeigte, Brenzcatechin, Protocatechusäure (in grosser Menge und schön krystallisirt). Es blieb auch wieder ein braunschwarzer in Natronlauge löslicher, aus derselben mit Schwefelsäure fällbarer Rückstand zurück, welcher der Elementaranalyse unterworfen wurde.

I. 0,1647 gr. gaben 0,0027 gr. Asche, 0,3982 gr. Kohlensäure und 0,0740 gr. Wasser.

II. 0,1945 gr. gaben 0,0033 gr. Asche, 0,4682 gr. Kohlensäure und 0,0892 gr. Wasser.

	I.	II.	Mittel.
C	67,03%	66,77%	66,9%
H	5,07 »	5,18 »	5,12 »

Nach dem, was an früherer Stelle über die Bedeutung der Bildung von Protocatechusäure beim Schmelzen der Huminsubstanzen mit Aetzkali gesagt wurde, konnte es keinem Zweifel unterliegen, dass wir es hier auch mit Huminsubstanzen zu thun hatten.

Sehr auffällig ist der hohe Kohlenstoffgehalt des Schmelzrückstandes. Da aber unsere Kenntnisse über die Huminsubstanzen noch vieles unerklärt lassen, so muss ich vorläufig

einfach die Thatsache anführen, ohne ihr irgend welche Bedeutung zusprechen zu wollen.

Wenn es auch fraglich war, ob der Kalkniederschlag aus der ammoniakalischen Lösung des Farbstoffes eine wirkliche Kalkverbindung des Letzteren darstellt, so schien es doch von Interesse zu sein, die procentische Zusammensetzung zu ermitteln.

Es stellte sich bei der Aschenbestimmung heraus, dass die Substanz ausser dem Calcium auch noch Eisen enthält. Zur quantitativen Bestimmung dieser zwei Elemente nebeneinander wurde dann in folgender Weise verfahren: Die Substanz wurde zuerst über freier Flamme, dann am Gebläse stark geglüht, der Rückstand in Salzsäure gelöst, die salzsaure Lösung mit Ammoniak alkalisch gemacht und dann mit frisch bereitetem Ammoniumsulfid behandelt. Das entstandene Schwefeleisen sammelte ich auf einem aschefreien Filter, wusch es mit warmem Wasser aus, löste es in concentrirter Salzsäure auf und spülte das Filter mit concentrirter Salpetersäure und heissem Wasser nach. Diese Lösung wurde am Wasserbade so weit eingedampft, bis eine deutliche Gelbfärbung eintrat. Nach dem Erkalten wurde dann die Lösung mit Ammoniak übersättigt, das Eisenoxydulhydrat auf ein aschefreies Filter gebracht, getrocknet, geglüht und als Eisenoxyd gewogen.

Die von dem Schwefeleisen abfiltrirte ammoniakalische Lösung, welche das Calcium enthielt, habe ich am Wasserbade zur Verjagung des Schwefelwasserstoff eine Stunde digerirt, dann mit oxalsaurem Ammoniak behandelt und 12 Stunden stehen gelassen. Der Niederschlag wurde dann auf ein aschefreies Filter gebracht, getrocknet, am Gebläse heftig geglüht und als Calciumoxyd gewogen.

Bei der Kohlen- und Wasserstoffbestimmung war ich wegen der schweren Verbrennbarkeit der Substanz genöthigt, dieselbe im Platinschiffchen mit einer abgewogenen Menge vorher sorgfältigst ausgeglühten Kupferoxyds zu vermischen, nach der Verbrennung das Schiffchen mit der Asche + Kupfer-

oxyd zu wägen, dann am Gebläse heftig zu glühen, wieder zu wägen und die Gewichts-differenz — als Kohlensäure — zur Gewichtsvermehrung in dem Liebig'schen Kalikugel-apparat zuzuschlagen.

Ich gewann bei der Elementaranalyse folgende Zahlen:

- I. 0,2508 gr. Substanz lieferten 0,1586 gr. Kohlensäure und 0,0260 gr. Wasser.
- II. 0,6716 gr. Substanz lieferten 9,6 ccm. Stickstoffgas bei 749 mm. Luftdruck, 17° C. und 800 mm. Höhe der Wassersäule im Absorptionsrohr.
- III. 0,3052 gr. Substanz lieferten 0,0046 gr. Eisenoxyd und 0,1218 gr. Calciumoxyd.
- IV. 0,9834 gr. Substanz lieferten 0,0138 gr. Eisenoxyd und 0,3965 gr. Calciumoxyd.

	I.	II.	III.	IV.
C	17,25 %	— %	— %	— %
H	1,15 »	— »	— »	— »
N	— »	1,62 »	— »	— »
Fe	— »	— »	1,24 »	1,16 »
Ca	— »	— »	28,51 »	28,80 »

Da anzunehmen ist, dass bei der Fällung der ammoniakalischen Lösung mit Calciumchlorid die Bildung von kohlen-saurem Kalk stattfinden kann und so in der Substanz eine gewisse Menge von Calcium an Kohlensäure gebunden enthalten sein mag, wollte ich mir über diese Verhältnisse durch eine Kohlensäurebestimmung Aufklärung verschaffen. Zu diesem Zwecke stellte ich mir einen kleinen, modificirten Will-Fresenius'schen Apparat zusammen.

1,9213 gr. Substanz zeigten nach der Einwirkung der Salzsäure einen Gewichtsverlust von 0,4178 gr. Die Substanz enthielt also 21,75% an Calcium gebundene Kohlen-säure. Um also den kohlen-sauren Kalk aus der Kalkverbindung des Farbstoffes zu eliminiren, muss man von den bei der Elementaranalyse gewonnenen Zahlen

5,93 % Kohlenstoff,
23,72 » Sauerstoff und
19,79 » Calcium

in Abzug bringen.

Ebenso glaube ich den Eisengehalt als Verunreinigung, welche aus den eisernen Gefässen, in denen der Harn gesammelt wurde, sowie aus Staubpartikelchen der Luft stammt, ansehen zu können. Zieht man also die entsprechenden Procentzahlen für den CaCO_3 und das Fe (als Fe_2O_3) von den bei der Elementaranalyse gewonnenen Werthen ab, so gestalten sich die letzteren in folgender Weise:

Kohlenstoff	22,57 %.
Wasserstoff	2,29 >
Stickstoff	3,23 >
Sauerstoff	54,23 >
Calcium	17,66 >

Im Allgemeinen will ich aber auf die bei der Elementaranalyse gewonnenen Zahlen kein besonderes Gewicht legen. Es fehlte mir leider an Zeit, zur Controlle noch weitere Bestimmungen zu machen, und so möchte ich als Resultat dieser Untersuchungen nur das hervorheben, dass es gelungen ist, aus dem Pferdeharn den braunen Farbstoff abzutrennen und seine Zugehörigkeit zu den Huminsubstanzen im obigen Sinn festzustellen.

Die Frage, woher diese Huminsubstanzen im Pferdeharn stammen, kann vor der Hand mit Sicherheit nicht beantwortet werden. Die Untersuchungen über den menschlichen Urin legen die Vermuthung nahe, dass ihre Entstehung vielleicht in analoger Weise erklärt werden könnte, wie es für die Huminsubstanzen im Menschenharn geschah. Ihre bedeutende Menge im Pferdeharn, sowie der Umstand, dass die dunkle Farbe des Harns erfahrungsgemäss mit der Heufütterung im Zusammenhange steht, machen es sehr wahrscheinlich, dass hier auch noch andere Factoren in Betracht gezogen werden müssen.

Es ist kaum zu bezweifeln, dass im Gras oder im Heu Stoffe enthalten sind, welche im Organismus zur Bildung von Huminsubstanzen Anlass geben können. Dies wird zwar erst dann sicher zu stellen sein, wenn solche Substanzen aus den Pflanzen gewonnen werden und ihr Einfluss auf die Farbe des Urins direct nachgewiesen wird; ich glaube aber doch

nach dem Gesagten schon jetzt die Meinung aussprechen zu dürfen: dass die dunkle Farbe des Pferdeharns mit der Nahrung der Thiere zusammenhängt. Mit Sicherheit kann behauptet werden, dass diese Färbung durch Huminsubstanzen bedingt ist.

Den Aerzten ist die Thatsache schon lange bekannt, dass bei Behandlung der Kranken mit gewissen Arzneimitteln die Farbe des Urins eine Veränderung erleidet. Einige von diesen Farbstoffen, welche im Urin erscheinen, sind schon in der Arznei enthalten: bei anderen dagegen sind es wahrscheinlich Zersetzungsproducte, welche den Harn charakteristisch färben.

Ich wollte zunächst den Einfluss einiger aromatischen Körper auf die Farbe des Harns prüfen, und zwar in erster Linie die des Phenols, von welchem es besonders seit der Einführung der antiseptischen Wundbehandlung allgemeiner bekannt ist ¹⁾, dass der Harn der mit ihm behandelten Kranken eine mehr oder weniger grünlichbraune, selbst schwärzliche Färbung zeigt, welche in den meisten Fällen um so ausgeprägter wird, je länger der Harn an der Luft steht.

Man hat die dunkle Farbe des Carbolharnes in sehr verschiedener Weise zu erklären versucht.

Wallace²⁾ meinte, dass die dunkle Farbe des Harns von Blutfarbstoff herrühre, welcher durch die Zersetzung des Blutes unter dem Einflusse des Phenols gelöst werde. Diese Behauptung wurde sehr bald widerlegt, da in der weit grössten Zahl von Carbolharnen sich Blut spectroscopisch wie chemisch nicht nachweisen liess.

Später nahm man an, und Bill³⁾ war es, welcher diese Vermuthung zuerst aussprach, dass das Phenol im Thierkörper

1) Hebra hat schon früher nach Theerbehandlung eine Dunkel-färbung des Urins beobachtet und dieselbe auf den Phenolgehalt des Theers zurückgeführt.

2) Brit. Med. Journ., 1870, 30. April.

3) American Journal of med. Science, 1870, S. 573.

zu Chinon oxydirt wird und diese Oxydation die dunkle Farbe des Harns bedingt. Andere Forscher meinten im Allgemeinen, dass dieser Farbstoff im Carbolharn, dessen Isolirung nicht gelang, aus unbekanntem Oxydationsproducten des Phenols abstammte.

Es war besonders Salkowski¹⁾, welcher betonte, dass die dunkle Färbung des Carbolharnes kaum zu der Menge des in den Organismus eingeführten Phenols im Verhältniss stehe, und dass es falsch sei, eine Carbolvergiftung dann anzunehmen, wenn der Harn recht dunkel geworden ist. In dieser Beziehung können nur die allgemeinen Intoxicationserscheinungen von Geltung sein.

Baumann und Preusse²⁾ fanden, dass sich aus Phenolharn Hydrochinon darstellen lässt; sie constatirten ferner, dass bei normalen Harnen, welche mit Hydrochinon versetzt wurden, nach einiger Zeit, von der Oberfläche aus in die tiefer gelegenen Schichten fortschreitend, eine ähnliche Färbung sich einstellt, wie sie der Carbolharn zeigt. Sie gaben dann Hunden Hydrochinon per os ein, und der Harn wurde ebenfalls dunkel gefärbt, wie bei der Phenolbehandlung. Baumann und Preusse sprachen dann die Meinung aus, dass ein kleiner Theil des Phenols im Thierkörper in Hydrochinon übergeführt wird, und dieses zwar zum grössten Theil als Aetherschwefelsäureverbindung im Harn erscheint, ein kleiner Theil aber zu gefärbten Producten weiter oxydirt wird, welche dem Harne die eigenthümliche Färbung verleihen.

Andere Untersuchungen brachten es zu Tage, dass ausser dem Phenol und Hydrochinon auch noch weitere aromatische Verbindungen im Stande sind, nach ihrer Einverleibung in den Organismus eine ähnliche dunkle Färbung des Urins hervorzurufen. Es schien darum schon a priori sehr wahrscheinlich, dass die Ursache der Färbung in allen Fällen dieselbe, oder wenigstens eine ähnliche ist.

¹⁾ Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. V, S. 354.

²⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., 1879, S. 245.

Ich habe zunächst die Versuche mit Phenol wiederholt. Einem mittelgrossen Hunde wurde in je 48 Stunden einmal in einer handtellergrossen Fläche Phenol auf die Haut mit einem Pinsel aufgetragen. Dies genügte, dass der Harn constant die dunkle Färbung zeigte, welche gewöhnlich nach einigen Stunden an der Luft beinahe in Schwarz überging.

Die Hunde vertragen das Einpinseln mit Phenol recht gut. Die innere Darreichung von Phenol in genügender Quantität ist bekanntlich mit manchen Schwierigkeiten verbunden; es sprechen ausserdem andere Erfahrungen ebenfalls dafür, dass die Dunkelfärbung des Harns nach äusserer Anwendung des Phenols am schnellsten zu Stande kommt.

Von dem mit Phenol behandelten Hunde wurde der Harn durch 3 Wochen gesammelt. Zur Abtrennung des Farbstoffes erwies sich folgendes Verfahren als am ehesten zum Ziele führend:

Der filtrirte Harn wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und dann mit Calciumchlorid gefällt. Auf diese Weise gelang es, den Harn recht gut zu entfärben. Den noch in Lösung gebliebenen Theil des Farbstoffes gewann ich, indem nach nochmaligem Zusatz von Ammoniak und Calciumchlorid das überschüssige Calcium durch Kohlensäure gefällt wurde. Den dabei erhaltenen Niederschlag vereinigte ich mit dem vorigen, wusch ihn mit kaltem und warmem Wasser, mit Alkohol und Aether aus und löste ihn nachher in Salzsäure auf. Die salzsaure Lösung wurde dann mit Ammoniak alkalisch gemacht. Das Ammoniak nahm aber nur einen geringen Theil des Farbstoffes in sich auf, ein recht beträchtlicher Theil wurde von dem voluminösen Niederschlage zurückgehalten. Durch fleissiges Schütteln desselben mit einer kaltgesättigten Ammoniumcarbonatlösung gelang es aber, den Farbstoff daraus bis auf Spuren zu gewinnen. Die vereinigten Lösungen wurden dann bei 60° C. etwas eingeengt und nachher mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert. Der Farbstoff fiel in zarten braunen Flocken aus; diese wurden am Filter mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, dann in Natronlauge gelöst, aus der-

selben mit Schwefelsäure gefällt, wieder ausgewaschen und nachher über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet.

Die so dargestellte Substanz bildete schwarze Blättchen, welche sich recht leicht pulverisiren liessen. Beim Erhitzen derselben mit Natronkalk war kein Ammoniak nachzuweisen.

Aus dem gesammten Harn des 3 Wochen lang mit Phenol behandelten Hundes konnten nicht mehr als 0,5740 gr. Substanz dargestellt werden. Ich musste demnach verzichten, die Substanz der Elementaranalyse zu unterwerfen, und beschränkte mich bloss darauf, das Schmelzen mit Aetzkali auszuführen.

Dieses Verfahren führte zu folgenden Zersetzungsproducten: Oxalsäure, fetten Säuren, welche weiter von einander nicht getrennt wurden, Brenzcatechin, Protocatechusäure und einem braunen, in Alkalien löslichen, aus denselben mit Säuren fällbaren Schmelzrückstand.

Es muss demnach nach den oben mitgetheilten Untersuchungen des Herrn Prof. Hoppe-Seyler angenommen werden, dass dieser aus dem Phenolharn gewonnene Farbstoff ebenfalls zu den Huminsubstanzen zu zählen ist, mit anderen Worten, dass die dunkle Farbe des Phenolharnes von Huminsubstanzen abhängt.

Zur Entscheidung darüber, ob andere aromatische Verbindungen eine gleiche Wirkung haben können, stellte ich noch zwei parallele Versuchsreihen mit Brenzcatechin und Hydrochinon an.

Diese Körper wurden, in wenig Wasser gelöst, mittelst der Schlundsonde den Thieren eingegeben, und zwar vom Hydrochinon 0,5 gr., vom Brenzcatechin 1,0 gr. jeden zweiten Tag. Der Harn beider Hunde zeigte dieselbe Färbung, wie der Phenolharn.

Ausserdem setzte ich zu normalem Harn Hydrochinon zu und liess ihn einige Stunden an der Luft stehen. Erst wenn die Verdunkelung eingetreten war, wurde der Harn zur weiteren Bearbeitung benützt.

Ich trennte den Farbstoff aus allen drei Harnportionen in ähnlicher Weise ab, wie es mit dem Phenolharn geschah.

Die Substanzen, welche mit Natronkalk erhitzt, ebenfalls kein Ammoniak lieferten, wurden dann jede für sich mit Aetzkali geschmolzen. In allen drei Fällen war die Bildung von Protocatechusäure nachweisbar, und somit die Zugehörigkeit auch dieser Farbstoffe zu den Huminsubstanzen im obigen Sinne ermittelt.

Der Umstand, dass Lösungen von Phenol und von anderen Benzolderivaten sich an der Luft braun färben und Huminsubstanzen liefern, legt die Annahme nahe, dass diese Körper auch im Urin in einer Form erscheinen, welche die Entstehung von Huminsubstanzen zulässt. Ich glaube auch kaum, dass die Farbstoffe im Phenol-, Hydrochinon- und Brenzcatechinharn wesentlich von einander verschieden sind. Sie sind alle als Huminsubstanzen aufzufassen. Das Fehlen des Stickstoffes in denselben macht es wahrscheinlich, dass ihre Bildung in dem unzersetzten Harn leicht erfolgt und nicht so bedeutender Eingriffe bedarf, dass dabei stickstoffhaltige Harnbestandtheile zerlegt werden müssten. Die Beobachtung, dass Phenolharn sich an der Luft immer intensiver färben, stimmt auch mit den Verhältnissen überein, welche im Allgemeinen auf die Bildung von Huminsubstanzen Einfluss haben.

Der Beschreibung dieser Versuche möchte ich noch zwei kleine Bemerkungen binzufügen. Masing¹⁾ hat Thieren Brenzcatechinelösungen in den meisten Versuchen subcutan oder intravenös beigebracht und fand schon nach relativ geringen Dosen heftige Vergiftungserscheinungen, besonders bei Kaltblütern. Bei Säugethieren war aber die Wirkung des Brenzcatechin ebenfalls eine recht prompte und schnelle. Da er bei Hunden mit der innerlichen Darreichung von Brenzcatechin nicht experimentirt hat, so kann ich natürlich keine Parallele zu meinen Versuchen ziehen. Ich möchte nur

¹⁾ Masing, Ein Beitrag zur Kenntniss der antiseptischen und physiologischen Eigenschaften des Brenzcatechin. Inaugural-Dissertation. Dorpat, 1882.

das betonen, wie verschieden sich auch die Säugethiere gegen die innere Verabreichung von Brenzcatechin verhalten.

Während Masing einen Kater von 4200 gr. Körpergewicht zu tödten im Stande war, wenn er demselben 0,30 gr. Brenzcatechin per os einführte, — so zeigte bei meinen Versuchen ein mittelgrosser Hund, welcher jeden zweiten Tag 1,0 gr. Brenzcatechin bekam, selbst nach zwei Wochen gar keine Vergiftungserscheinungen. Ich gab dann versuchsweise einem grossen, 35 Kilo schweren Hunde 2,0 gr. Brenzcatechin pro dosi ein und konnte ebenfalls keine Störung in den Functionsverrichtungen des Thieres beobachten.

Das einzige Symptom bei allen diesen Thieren war die dunkle Farbe des Harns. Das Auftreten von blutigem Urin, welches Masing beobachtet hat, konnte ich niemals constatiren. Die Harne waren immer eiweissfrei und es konnte in denselben Blut weder spectroscopisch noch chemisch nachgewiesen werden.

Wenn auch die mitgetheilten Untersuchungen in mancher Beziehung noch einer Ergänzung bedürfen, und wenn auch unsere Kenntnisse über die Huminsubstanzen im Allgemeinen noch vielfach mangelhaft sind, so möchte ich die Publication dieser Arbeit schon jetzt darum für gerechtfertigt halten, weil es immerhin von Interesse ist, constatirt zu haben, dass die Huminsubstanzen auch im thierischen Organismus eine Rolle spielen. Ich glaube auch, dass manchen Missverständnissen in der Lehre von den Harnfarbstoffen bei dieser Auffassung vorgebeugt werden kann.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Prof. Hoppe-Seyler für die Anregung und Rathschläge, mit welchen er mich bei meiner Arbeit unterstützte, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.