

# Ueber die Bildung von flüchtigen Fettsäuren bei der ammoniakalischen Harngährung.

Von

**Prof. E. Salkowski.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 20. September 1888.)

Der unverkennbare Geruch nach flüchtigen Fettsäuren, den ich an einem gefaulten Harn schon an sich, mehr aber noch nach Zusatz von Schwefelsäure beobachtete, veranlasste mich, eine Anzahl vergleichender Versuche über den Gehalt von frischem und ammoniakalisch gährendem Harn an flüchtigen Fettsäuren zu machen, welche zur Auffindung der bisher, wie es scheint, übersehenen Thatsache führten, dass der normale, in ammoniakalische Gährung gerathene Harn einen nicht ganz unbedeutlichen Gehalt an flüchtigen Fettsäuren aufweist. Ohne Zweifel sind diese, neben anderen z. Th. unbekanntem Substanzen, an dem äusserst haftenden, schlechthin als «urinös» bezeichneten Geruch ammoniakalischer Harnen betheiligt.

Die angegebene Thatsache war sehr leicht zu constatiren.

Von normalem eiweiss- und zuckerfreiem Harn wurden zwei Portionen zu je 300 ccm. abgemessen, die eine sofort mit Säure destillirt, die andere erst, nachdem sie in ammoniakalische Gährung übergegangen war, in beiden Fällen die Destillate titirt. Zum Ansäuern wählte ich concentrirte Schwefelsäure und zwar 10 ccm. + 20 ccm. Wasser. Die Quantität der Säure wurde absichtlich so gross gewählt, weil

man nach der Angabe von v. Rockitansky<sup>1)</sup> nur in diesem Falle sicher ist, die flüchtigen Fettsäuren vollständig zu erhalten. Abdestillirt wurden stets gleiche Mengen, und zwar 230 bis 240 cbem., so dass etwa 90 cbem. im Destillirkolben blieben. Die Titrirung geschah mit Einviertel-Normallauge; als Indicator erwies sich Læmuspapier am geeignetsten.

Die ammoniakalische Gährung trat innerhalb sehr wechselnder Zeit ein: eine Temperatur von 22 bis 25° C. schien für den Eintritt am günstigsten, Bruttemperatur nicht förderlich zu sein. Häufig wurde der Harn mit einigen Tropfen gährenden Harns geimpft, um den Eintritt der Gährung zu beschleunigen.

Nachfolgende kleine Tabelle enthält die an 8 Harnproben erhaltenen Werthe:

Nummer der Harnprobe.	Specificisches Gewicht.	Reaction des Harns		Das Destillat aus 300 cbem. braucht Einviertel-Normallauge		Zeit zwischen den beiden Untersuchungen.
		a) frisch.	b) zersetzt.	a) frisch.	b) zersetzt.	
I.	1018	sauer	stark alkalisch	2,2 cbem.	12,9 cbem.	2 Tage
II.	1020	do.	do.	1,9 »	17,6 »	2
III.	1021	do.	schwach alkal.	2,4 »	10,0 »	4
		do.	stark alkalisch	2,5 »	14,2 »	6
IV.	1017	do.	schwach alkal.	1,9 »	9,0 »	3
V.	1020	do.	do.	1,6 »	8,0 »	4
VI.	1016	do.	stark alkalisch	1,4 »	14,3 »	5
VII.	1017	do.	do.	2,2 »	11,6 »	2

Im Mittel aus 8 Versuchen erforderten somit die flüchtigen Fettsäuren aus 300 cbem. frischen Harns 2,0 cbem. Einviertel-Normallauge, die des gefaulten Harns 12,2 cbem. Die Vermehrung betrug also mehr als das 6fache. In Wirklichkeit ist sie sicher höher zu veranschlagen, da alle Destillate Spuren von Salzsäure enthielten. Da der Gehalt hieran in den Destillaten aus gefaultem Harn nicht grösser war, wie in den aus frischem Harn erhaltenen, auch nicht abzusehen

<sup>1)</sup> Oesterr. Med. Jahrb., 1887.

ist, warum dieses der Fall sein sollte, so ist anzunehmen, dass der durch den minimalen Salzsäuregehalt verursachte Fehler in allen Fällen derselbe war. Es ist einleuchtend, dass die Vermehrung gegenüber dem frischen Harn dadurch geringer erscheinen muss, als sie in Wirklichkeit war. Es kommt ferner in Betracht, dass einige der untersuchten Harn sich noch im Beginn der ammoniakalischen Gährung befanden.

Rechnet man den mittleren Werth für die flüchtigen Säuren des normalen Harns auf eine Tagesquantität von 1500 cbcm. aus, so würden dieselben 10 cbcm. Einviertel-Normallauge = 2,5 cbcm. Normallauge zur Neutralisation erfordern. Nimmt man als flüchtige Säure Essigsäure an, so entspricht die angegebene Quantität Natronlauge 0,15 gr. Essigsäure. v. Rockitansky fand für die 24stündige Harnmenge im Mittel einen Gehalt von 0,0545 gr. Fettsäuren, in zwei Fällen aber, in denen reichlich Kohlehydrate gemessen waren, wurden aus der 24stündigen Harnmenge 0,417 resp. 0,406 gr. fettsaures Natron erhalten. Der oben angeführte Werth von 0,15 gr. Essigsäure ist ohne Zweifel etwas zu hoch, liegt aber jedenfalls innerhalb der von v. Rockitansky angegebenen.

Die flüchtigen Fettsäuren aus dem gefaulten Harn würden, auf 1500 cbcm. umgerechnet, 15,25 cbcm. Normalnatronlauge erfordern, entsprechend 0,915 gr. Essigsäure pro Tag.

Sehr auffällig sind die grossen Schwankungen in den Einzelwerthen. Die Quantität des erforderten Natron hängt weder von der Dauer des Stehens des Harns, noch von seiner Concentration ab, sondern augenscheinlich von der Intensität der ammoniakalischen Gährung. So erklärt sich, dass gerade die Destillate von zwei Harnen, die nur 2 Tage gestanden hatten, am meisten flüchtige Fettsäuren enthielten, in Uebereinstimmung mit einem starken Gehalt an Ammoniumcarbonat.

Man könnte nun vielleicht der Vermuthung Raum geben, dass die im Destillat des gefaulten Harns vorhandene Säure zu einem ansehnlichen Theil gar nicht flüchtige Fettsäure sei, sondern Kohlensäure, aus dem Ammoniumcarbonat stammend. Ein solches Destillat würde, mit Natronhydrat in der Kälte titirt, gleichfalls neutrale Reaction annehmen, sobald sich

das primäre Salz gebildet hat. Allein diese Vermuthung lässt sich leicht als irrthümlich erweisen.

1. Erhitzt man das neutralisirte Destillat nach dem Titriren, so muss, falls Kohlensäure im Spiel ist, die Reaction alkalisch werden, indem sich das Mononatriumcarbonat in Dinatriumcarbonat und entweichende Kohlensäure spaltet. Dies ist jedoch nicht der Fall. Im Gegentheil: die neutralisirten Destillate nehmen bei erneutem Destilliren resp. Eindampfen schwach saure Reaction an. Die Ursache davon ist die Gegenwart von Spuren von Ammoniak im Destillat, an Fettsäuren gebunden, welches beim Eindampfen mehr oder weniger vollständig entweicht. In der That ist sowohl im ersten, als auch im zweiten Destillat Ammoniak durch Nessler'sches Reagens nachweisbar.

2. Ammoniakalischer Harn wurde zur Entfernung der Kohlensäure mit Barytwasser und Chlorbaryum ausgefällt, filtrirt, das Filtrat mit Schwefelsäure im Ueberschuss versetzt, vom Baryumsulfat abfiltrirt und destillirt. Das Destillat aus 300 ccm. Harn brauchte 13,6 ccm. Einviertel-Normalnatron.

3. Endlich wurde frischer Harn mit Ammoniumcarbonat versetzt bis zur stark alkalischen Reaction, dann mit Schwefelsäure angesäuert und destillirt. Das Destillat brauchte zur Herstellung neutraler Reaction 2,2 ccm. Einviertel-Normalnatron, die direct verarbeitete Controllportion 2,0 ccm.

Es ist also ausgeschlossen, dass ein irgend in's Gewicht fallender Theil der flüchtigen Säure aus dem zersetzten Harn Kohlensäure ist.

Bleibt der Harn lange Zeit der Fäulniss überlassen, so ist die aus ihm zu erhaltende Quantität Fettsäure weit grösser. Eine Quantität normalen Harns war 5 Wochen lang bei Sommertemperatur sich selbst überlassen. 300 ccm. dieses Harns lieferten beim Destilliren mit Schwefelsäure Fettsäure entsprechend 31,8 resp. 32,4 ccm. oder im Mittel 32,1 ccm. Einviertel-Normalnatron. Dieses würde für 1500 ccm. Harn nicht weniger als 2,408 gr. Essigsäure ergeben.

Zur näheren Feststellung der Natur der flüchtigen Fettsäuren aus gefaultem Harn wurden zunächst die neutralisirten Destillate aus den in der Tabelle angeführten Versuchen, soweit sie aus zersetztem Harn stammten, successive vereinigt und auf dem Wasserbad völlig zur Trockne gedampft (in vielen Fällen waren die neutralisirten Destillate vorher noch einer erneuten Destillation unterworfen worden). Der Rückstand wurde mit verdünnter Schwefelsäure destillirt, bis Benzoësäure überzugehen anfang. Das Destillat war klar, zeigte jedoch an der Oberfläche einige Oeltröpfchen und Spuren von Benzoësäurekrystallen, es roch unverkennbar nach Buttersäure und war vollkommen frei von Salzsäure. Es wurde, ohne die Oeltröpfchen abzuschneiden, mit Ammoniak alkalisirt, die klare Flüssigkeit auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingedampft — sie reagirte danach schwach sauer —, erkalten gelassen und mit Silbernitratlösung in geringem Ueberschuss gefällt. Die entstandene breiige Masse wurde mit Wasser verdünnt, der Niederschlag abfiltrirt, einigemal mit Wasser gewaschen, auf porösem Porzellan abgesogen und im Dunkeln über Schwefelsäure getrocknet, und zwar der zu den Analysen bestimmte Theil bis zur Gewichtsconstanz. Das erhaltene Silbersalz war fast weiss mit leichtem bräunlichen Ton, die Waschwässer zeigten beim Stehen, schneller beim Erhitzen Reduction, vielleicht von Ameisensäure herrührend.

1. 0,3399 gr. des Silbersalzes hinterliessen bei anhaltendem Glühen 0,2133 gr. metallisches Silber = 62,75%.

2. 0,3175 gr. gaben 0,1997 gr. Silber = 62,90%.

Essigsäures Silber erfordert 64,67 Ag, propionsäures 59,67%.

Unter der Annahme, dass das Destillat nur Essigsäure und Propionsäure enthielt, würde die Essigsäure also etwas mehr als die Hälfte betragen (ein Gemisch gleicher Theile propionsäures und essigsäures Silber enthält 62,17% Ag). Da aber ohne Zweifel auch höhere, unlösliche Fettsäuren vorhanden waren mit geringerem Silbergehalt der Silbersalze, ferner, nach dem Geruch zu urtheilen, auch Buttersäure, ja selbst etwas Benzoësäure, so kommt man wohl der Wahrheit näher, wenn man ein Ueberwiegen der Essigsäure unter den

Producten der ammoniakalischen Gährung annimmt. Da die genauere Feststellung dieses Thatbestandes kein erhebliches Interesse bietet, so habe ich dieselbe vorläufig aufgeschoben.

Ganz ebenso wurde auch mit dem Destillat aus 600 cbcm. Harn, der 5 Wochen gestanden hatte, verfahren. Das Silber-salz war vollkommen weiss, das Waschwasser zeigte keine Reduction. Der Silbergehalt des bis zur Gewichtsconstanz über Schwefelsäure getrockneten Silbersalzes wurde etwas niedriger gefunden.

1. 0,383 gr. gaben 0,2377 Ag = 62,06%.

2. 0,1597 gr. gaben 0,0991 Ag = 62,05%.

Was nun die Quelle der flüchtigen Fettsäuren betrifft, so liegt es sehr nahe, hierbei an den von so vielen Seiten als sicher angesehenen Gehalt des Harns an Traubenzucker resp. an Kohlehydraten zu denken. Dieses war auch der Gesichtspunkt, von welchem aus es mir der Mühe werth erschien, die im Eingang der Abhandlung erwähnte Beobachtung weiter zu verfolgen. Es ist nicht meine Absicht, näher auf die Geschichte dieser Frage einzugehen, ich glaube aber, so viel wird man allgemein zugeben, dass die Beweise für die Gegenwart kleiner Quantitäten von Zucker resp. Kohlehydraten im Harn sich in neuerer und neuester Zeit mehr und mehr gehäuft haben. Von besonderem Interesse sind in dieser Beziehung aus neuester Zeit die Beobachtungen von v. Udranszky.

Nachdem v. Udranszky<sup>1)</sup> einerseits gezeigt hat, dass sich bei der Einwirkung von Schwefelsäure auf Zucker Furfurol bildet, andererseits dass sich aus dem Harn durch Benzoylchlorid und Natronlauge Niederschläge erhalten lassen, welche mit Schwefelsäure Furfurol bilden, endlich dass das Furfurol in charakteristischer Weise mit  $\alpha$ -Naphthol + Schwefelsäure reagirt, ist es in der That sehr wahrscheinlich geworden, dass der Harn stets Kohlehydrate enthält und die Reaction des Harns mit  $\alpha$ -Naphthol + Schwefelsäure auf seinem

1) Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 377.

Gehalt an Zucker resp. Kohlehydraten beruht, wie Molisch<sup>1)</sup> von Anfang an, jedoch ohne ausreichende Begründung, behauptet hat.

Enthält der normale Harn in der That Kohlehydrate, so war es im höchsten Grade wahrscheinlich, dass sie bei der ammoniakalischen Gährung zersetzt werden, und durchaus verständlich, dass sie dabei in flüchtige Fettsäuren resp. Essigsäure übergehen. Den Prüfstein für die Richtigkeit aller dieser Erwägungen bildet nun offenbar das Verhalten des zersetzten Harns zu  $\alpha$ -Naphthol + Schwefelsäure. Bleibt die Reaction hiermit in diesem Harn aus, so ist in der That nicht daran zu zweifeln, dass der Harn Kohlehydrate enthält und diese die Quelle der Fettsäuren sind. Es müssten, um diesen Schluss zu entkräften, noch andere Substanzen ausser den Kohlehydraten im Harn existiren, welche die Reaction von Molisch geben, der fermentativen Spaltung fähig sind und dabei flüchtige Fettsäuren liefern. Solche aber kennen wir bisher nicht, es kämen höchstens die Eiweisskörper in Betracht. Diese sind aber, wenn überhaupt, nur in verschwindenden Spuren im Harn enthalten.

In der That verhält sich Harn, der lange Zeit gefault hat, bei Anstellung der Reaction von Molisch wesentlich anders, wie frischer Harn. Macht man die Prüfung, wie v. Udránszky vorgeschlagen hat, mit 1 bis 2 Tropfen Harn, so erhält man gar keine Reaction; nimmt man mehr Harn, so bleibt sie nicht ganz aus, ist aber unvergleichlich schwächer, als in frischem Harn. Damit ist meines Erachtens erwiesen, dass die Fettsäuren des ammoniakalisch gährenden Harns aus in dem Harn enthaltenen Kohlehydraten stammen.

Dieser indirecte Nachweis für die Anwesenheit von Kohlehydraten im Harn ist nun freilich seitdem überholt worden dadurch, dass Wedenski unter Baumann's Leitung Benzoylverbindungen des Traubenzuckers und einer dextrin-ähnlichen Substanz aus normalem Harn dargestellt und ihre Identität durch die Analyse erwiesen hat, wie Baumann in

1) Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss., Bd. 93, 2. Abth., S. 912.

den Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XXI, S. 2744 kurz mittheilt; dass dieser directe Nachweis allen auf einer Reihe von Schlüssen beruhenden weit überlegen ist, ist selbstverständlich. Allein die Notiz von Baumann lag bei Abschluss meiner Versuche noch nicht vor und ich halte auch trotz derselben meine Beobachtungen für mittheilenswerth, so sehr sie auch durch dieselbe an Interesse eingebüsst haben.

Eine Erscheinung harrt übrigens noch der Aufklärung. Nach v. Udránszky sind an der Entstehung der Huminsubstanzen beim Erhitzen des Harns mit Säuren die Kohlehydrate desselben betheilig. Man sollte dementsprechend erwarten, dass gefaulter Harn, der wenigstens des grössten Theiles seiner Kohlehydrate beraubt ist, beim Kochen mit Säuren keine Huminsubstanzen liefert. Dem ist jedoch nicht so. Der zersetzte Harn lieferte gleichfalls Huminsubstanzen und zwar anscheinend nicht weniger, wie der frische, deren Zusammensetzung allerdings möglicherweise eine andere sein könnte. Ebenso ist es auffallend, dass der zersetzte Harn beim Erhitzen mit Schwefelsäure die Schiff'sche Furfurolreaction noch in ausgeprägter Weise giebt, welche nach v. Udránszky gleichfalls auf die Anwesenheit von Kohlehydraten im Harn zu beziehen ist. Diese Beobachtungen bedürfen noch der Aufklärung durch weitere Untersuchungen.

Reicht nun aber der Gehalt an Kohlehydraten im Harn überhaupt aus, um die Entstehung verhältnissmässig grosser Mengen von Fettsäuren zu erklären? Diese Frage ist um so mehr aufzuwerfen, als die Zersetzung der Kohlehydrate bei der ammoniakalischen Gährung anscheinend keine ganz vollständige ist. Nehmen wir den für diese Annahme günstigsten Fall an, dass nur Essigsäure aus dem Traubenzucker entsteht und keinerlei Nebenproduct, so müssten 1500 ccm. 2,408 gr. Traubenzucker enthalten oder 100 ccm. 0,16 gr. Ein Gehalt von 0,16% müsste sich durch die Gährungsprobe zu erkennen geben, die in fast allen untersuchten Harnen angestellt ist und regelmässig negativ ausfiel. So hoch kann der Gehalt des normalen Harns an Zucker nicht sein. Nun können wir zwar annehmen, dass auch andere, nicht der

alkoholischen Gährung fähige Kohlehydrate im Harn vorhanden und an der Bildung der Fettsäuren betheilt sind, immerhin aber muss man die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass nicht nur die Kohlehydrate, sondern auch andere Harnbestandtheile bei der ammoniakalischen Gährung Fettsäuren liefern könnten. Von diesem Gesichtspunkt aus habe ich einige vorläufige Versuche angestellt.

1. Harnsäure fand sich in dem 5 Wochen alten Harn in reichlicher Menge, und zwar nur Spuren in Lösung, durch das Silberverfahren nachweisbar, die Hauptmenge im Sediment. Die mikroskopische Untersuchung desselben zeigte die bekannten knolligen Formen, die man als harnsaures Ammon zu bezeichnen pflegt. (Ich möchte bei dieser Gelegenheit bemerken, dass mir die Richtigkeit dieser Bezeichnung sehr zweifelhaft erscheint. Auusserlich vollkommen gleiche Drüsen und Knollen bildet unter Umständen das Magnesiumsalz der Harnsäure.)

2. Auch Kreatinin ist reichlich in dem zersetzten Harn enthalten. Derselbe giebt sowohl die Weyl'sche Kreatininreaction in sehr ausgeprägter Weise (auch nach dem Kochen) in Uebereinstimmung mit den Angaben von Colasanti<sup>1)</sup>, als auch Kreatininchlorzink in ansehnlicher Menge bei entsprechender Bearbeitung. Es diente hierzu der beim Destilliren des Harns mit Schwefelsäure im Kolben bleibende wässrige Rückstand. Derselbe wurde mit Wasser verdünnt, mit Barytwasser gefällt, filtrirt, das Filtrat mit Salzsäure neutralisirt, eingedampft, Rückstand mit Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug mit Chlorzink und ein wenig Natriumacetat versetzt. Ob die Quantität des Kreatinins keinerlei Abnahme erfährt, ist freilich noch festzustellen, nach der Quantität des erhaltenen Kreatininchlorzink ist es mir wahrscheinlich, dass das Kreatinin nicht angegriffen wird. Das angewendete Verfahren scheint auch für frischen Harn sehr brauchbar zu sein.

1) Moleschott's Untersuchung. zur Naturlehre, XIII, Sep.-Abdr.

3. Der Gehalt an durch Destillation mit Säuren zu erhaltendem Aceton, der nebenher (ohne Zusammenhang mit der Frage der Abstammung der Fettsäuren) untersucht ist, scheint durch die ammoniakalische Gährung keine Aenderung zu erfahren. Das Aceton ist dabei allerdings nicht quantitativ bestimmt, sondern nach der Menge des beim Zusatz von Jod-Jodkaliumlösung und Natronlauge ausfallenden Jodoform geschätzt. Selbstverständlich musste ich dabei darauf Bedacht nehmen, möglichst alles Aceton (resp. jodoformbildende Substanz) in das Destillat zu erhalten, das überhaupt aus dem Harn zu gewinnen war. Hierzu genügt es nicht, wenn man nur etwa die ersten übergehenden 10 ccm. auffängt. Durch gesondertes Auffangen von je 10 ccm. bei Anwendung von 300 ccm. Harn kann man sich leicht überzeugen, dass in der 5. Portion die Reaction mitunter noch recht deutlich ausfällt. Mit den ersten 50 ccm. ist die Hauptquantität überdestillirt, aber bei Weitem noch nicht alles. Fängt man das Destillat in Antheilen von je 50 ccm. auf, so giebt noch der 4. Antheil (viel weiter lässt sich die Destillation nicht treiben) eine Abscheidung von Jodoform.

Mit Recht schreibt daher auch v. Jacksch<sup>1)</sup> für seine Methode der quantitativen Bestimmung des Acetons vor, so viel als möglich abzudestilliren. Ich möchte aber auch für die qualitative Prüfung empfehlen, bei Anwendung von 300 ccm. wenigstens 100 ccm. abzudestilliren; unwillkürlich wird man sich doch auch bei der qualitativen Prüfung auf Aceton ein Urtheil über die Menge des Acetons bilden, man thut daher gut, die zweiten 50 ccm. Destillat, die noch recht viel Jodoform liefern im Verhältniss zum ersten Destillat, nicht zu vernachlässigen.

Mitunter habe ich die Untersuchung auf Aceton auch mit der Untersuchung auf flüchtige Fettsäuren vereinigt, indem ich das erste Destillat zuerst titrirte, dann auf's Neue überdestillirte.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 551.

Endlich bemerke ich noch, dass mir die Quantität der dem Harn zuzusetzenden Säure bei der Untersuchung auf Aceton mehr Beachtung zu verdienen scheint, als ihr bisher zugewendet ist. Für den qualitativen Nachweis findet sich keine bestimmte Vorschrift, es heisst meistens nur, dass man den Harn ansäuern soll. Durch Doppelversuche aus demselben Harn habe ich mich überzeugt, dass ein Zusatz von 1 ccm. concentrirter Schwefelsäure zu 300 ccm. Harn nicht genügt, da man mit demselben Harn bei Zusatz von 10 ccm. conc. Schwefelsäure entschieden mehr Jodoform bekommt. Dass gerade eine so grosse Quantität erforderlich, kann ich natürlich nicht behaupten. v. Jaksch schreibt bei seiner Methode der quantitativen Bestimmung 3 ccm. Salzsäure auf 100 ccm. Harn vor: auch dieser Zusatz scheint mir etwas zu gering zu sein, indessen möchte ich dies nicht bestimmt behaupten.

4. Phenol resp. Kresol wurde in gefaultem Harn vermehrt gefunden, wie bereits Baumann angegeben hat. Die Vermehrung rührt nach ihm bekanntlich von der Spaltung der Oxysäuren und Aetherschwefelsäuren her.

5. Das Reductionsvermögen des gefaulten Harns für Kupferoxyd in alkalischer Lösung und Silberoxyd ist ein ziemlich starkes.

Eine weitere Quelle für die flüchtigen Fettsäuren, als die Kohlehydrate, hat sich also bisher nicht ergeben, doch soll die Untersuchung hierüber, sowie über die ammoniakalische Harngährung überhaupt noch fortgesetzt werden.