

Ueber das Vorkommen von Gallensäuren, Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren.

Nach Untersuchungen des Herrn Dr. Karl Beier mitgetheilt

von

E. Stadelmann.

(Der Redaction zugegangen am 29. Juli 1893.)

Erst sehr allmählig beginnt sich das Dunkel zu lichten, in welches unsere Kenntnisse über die Function der Nebennieren, dieser so unscheinbaren kleinen Organe, bis jetzt noch eingehüllt sind. Auch noch heute zu Tage werden jedem Mediciner die Experimente von Brown-Sequard¹⁾ von Interesse sein mit Rücksicht darauf, dass er nach Exstirpation derselben bei Thieren schnellen Tod und eine Anhäufung von Pigment auffand, weil dieses Versuchsergebniss eine Analogie in unseren Erfahrungen über Morbus Addisonii und der dabei so häufigen Erkrankung der Nebennieren hat. Irgend eine Aufklärung über die Function der Nebennieren haben uns allerdings die Experimente von Brown-Sequard nicht gebracht.

Bedeutend mehr leistet hier die in neuester Zeit von Jacoby²⁾ veröffentlichte hochinteressante Arbeit, nach welcher den Nebennieren eine bis jetzt vollständig unbekannt Function zuzuerkennen wäre. Er hält die Nebennieren für hauptsächlich nervöse Organe, welche die Peristaltik des Darms in der Weise beeinflussen, dass sie dieselbe hemmen. Nach ihrer Exstirpation werden durch Vagusreizung stürmische Darmbewegungen ausgelöst, welche bei Vagusreizung allein ohne Entfernung der Nebennieren ausbleiben. Die Reizung der Nebenniere oder der Nerven, welche von ihr zum Gangl.

¹⁾ Compt. rend. 1857, Th. II, S. 1036.

²⁾ Archiv f. experiment. Patholog. u. Pharmakol., Bd. XXIV, S. 171.

coeliac. ziehen, setzt den in Bewegung befindlichen Darm unmittelbar zur Ruhe. Ferner fand Jacoby, dass ihre Reizung die Secretionsgeschwindigkeit der Niere bedeutend herabsetzt. Die Wirkung von Giften, welche die Peristaltik stark anregen, wird durch Nebennierenreizung aufgehoben.

Die Nebennieren wurden nun auch vielfach chemisch untersucht und die darüber erschienenen Publikationen berichten von mehreren Körpern, welche in ihnen zu finden seien.

Zuerst hat man in ihrer Marksubstanz neben Eiweisskörpern ein oder mehrere Chromogene gefunden. Cloëz und Vulpian, Krukenberg, Virchow u. A. beschreiben uns die Reactionen dieses Körpers; er besitzt die Eigenschaft, sich unter dem Einfluss verschiedener Agentien charakteristisch zu färben. So macht wässrige Jodlösung, Chlor- und Bromwasser eine carminrothe Färbung; dasselbe bewirkt die Mehrzahl der oxydirenden Stoffe, ferner der Sauerstoff der Luft und das Sonnenlicht, wenn es auf den Wasserauszug der Medullarsubstanz einwirkt. Extrahirt man die Nebennieren mit verdünnter Salzsäure, so färbt sich dieser Auszug bei Zusatz von überschüssigem Ammoniak schön roth. Die Substanz, welche diese Färbungen bewirkt, ist in sehr verdünnten Säuren löslich, so auch in Essigsäure und zwar sind die Säurelösungen gelb, bei Zusatz von Ammoniak scheidet sich die ganze Menge des Farbstoffes in violetten Flocken ab, was auf eine basische Natur des Farbstoffes hinweist (Holm¹). Unlöslich ist dieser Farbstoff nach Holm und Hoppe-Seyler in Alkohol, Aether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol; Alkalien nehmen nur wenig von ihm auf. Isolirt und rein dargestellt, hat man diesen Körper noch nicht; nach Virchow²) sind nicht die morphologischen Elemente Träger der Farbe, sondern der Farbstoff ist in der Intercellularflüssigkeit enthalten, was er an mikroskopischen Präparaten durch die Jodreaction bewiesen hat.

Dieser Farbstoff mit seinen Eigenschaften ist hier angeführt, weil bei den folgenden Untersuchungen auf Gallensäuren

¹) Journal f. pract. Chemie, Bd. C, S. 152.

²) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 482.

eine Farbenreaction zur Anwendung kam, welche ebenfalls roth gefärbte Produkte lieferte. Bei der Untersuchung der Nebennieren auf Hippursäure muss noch einmal auf dieses Chromogen zurückgekommen werden.

Ferner fand man in den Nebennieren: Eiweiss, Substanzen des Bindegewebes, Salze, von denen Cloëz und Vulpian als besonders reichlich Chlorkalium angeben, dann auch Chlornatrium und Phosphate. Ferner Fette, welche in grosser Menge vorhanden sind. Man sieht beim Erwärmen einer zerriebenen Masse von Nebennieren auf der Flüssigkeit sehr grosse, intensiv gelbe Tropfen sich abscheiden, die bei gewöhnlicher Temperatur erstarren. Dieses Fett geht nach Virchow¹⁾ durch Einwirkung von Schwefelsäure Farbenveränderungen ein, welche den bei der später zu beschreibenden Furfurolreaction in Verbindung mit Gallensäuren auftretenden sehr ähnlich sind. Die gelbe Farbe des Fettes geht dabei in roth und weiterhin in dunkelblau über.

Ferner fand man in den Nebennieren Lecithin, Neurin, Glycerinphosphorsäure und Leucin, welch' Letzteres von Hammarsten²⁾ für ein Zersetzungsprodukt gehalten wird. Virchow³⁾ dagegen spricht von sehr reichlichen Leucinmengen; er sagt: «Schon die schön violette Lösung, welche man in dem ausgezogenen Saft durch Kali und Kupfersulphat erhält, deutet darauf hin». Es fand jedoch Holm⁴⁾ nur sehr wenig Leucin, Seligson⁵⁾ gar keins. Nach Külz⁶⁾ enthalten die Nebennieren Inosit.

1857 veröffentlichten Cloëz und Vulpian⁷⁾ eine Arbeit, in welcher sie die Anwesenheit von Taurocholsäure, Taurin

1) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 104.

2) Lehrbuch der physiolog. Chemie.

3) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 483.

4) Journal für pract. Chemie, Bd. C., S. 151.

5) De pigmenti patholog. ac morb. Addis., adject. chemic. glandul. supraren. Dissert. Berlin 1858.

6) Sitzungsber. d. Marburger Gesellschaft zur Beförder. d. ges. Naturwiss. 1876, Nr. 4. Citirt nach Hoppe-Seyler, Physiolog. Chemie 1881, S. 722.

7) Note sur l'existence des acides hippurique et choléique dans les capsules surréculés des animaux herbivores. Compt. rend. T. II, 1857.

und Hippursäure in den Nebennieren des Hammels nachgewiesen haben wollten.

Auch Virchow ist geneigt, die Existenz von Gallensäuren in den Nebennieren anzunehmen. Er sagt¹⁾ aber: »Die Anwesenheit von Gallenstoffen in den Nebennieren muss insofern mit einiger Vorsicht aufgenommen werden, als die unmittelbare Nähe der Leber und der Gallenblase für die rechte Nebenniere wenigstens die Imbibition sehr begünstigt«. Auch Hoppe-Seyler²⁾ macht den Einwurf, dass Hippursäure und Benzoësäure von den Nieren, Taurocholsäure von der Gallenblase oder Leber her durch Imbibition ins Nebennierengewebe eingedrungen sein könnten. Für die vorliegenden Versuche kann dieser Einwand wohl zurückgewiesen werden, da die Nebennieren dem eben getödteten, noch warmen Thier entnommen wurden, so dass von einer stattgehabten Imbibition nicht die Rede sein konnte.

Virchow fährt dann weiter fort: «Indess war es mir auch schon aufgefallen, dass ich durch Digestion menschlicher, mit aller Vorsicht gesammelter und präparirter Nebennieren eine Flüssigkeit erhielt, die nach dem Filtriren eine eigenthümliche, bald gelbe, bald röthlich-braune Farbe zeigte und bei dem Verdampfen sich mit dunkelviolettblauen Häuten überzog. Dieselbe gab, nachdem sie etwas eingeengt war, die Pettenkofer'sche Probe sehr schön und nahm mit Mineralsäuren, besonders mit Salpetersäure, eine grünliche Färbung an».

Virchow hat hier nichts von der Entfernung der Eiweissstoffe und Fette aus der Macerationsflüssigkeit gesagt, und daher ist bei ihm der positive Ausfall der Pettenkofer'schen Reaction, der die Anwesenheit von Gallensäuren darthun sollte, nicht beweisend.

Ueber das Vorkommen schwefelhaltiger Stoffe in den Nebennieren sagt Virchow weiterhin: «Die rosige Farbe, welche das Jod erzeugt, erinnert etwas an das freilich brillantere Violett, welche Jod in Schwefelkohlenstoff hervorbringt

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 481.

²⁾ Lehrb. d. physiol. Chemie 1881.

und auch die intensiv grüne Farbe der Eisensalze könnte auf eine Schwefelverbindung hindeuten. Indess deuteten andere Reactionen weder Schwefelkohlenstoff noch Schwefelwasserstoff als solche in dem Saft an und obwohl sich die Substanz ziemlich lange erhält, so ist doch die Reaction um so zuverlässiger, je frischer die Organe sind. Ich lasse es daher dahingestellt, ob diese Reactionen irgend etwas mit dem Taurin zu thun haben».

Die Existenz von Taurin und Benzoësäure in den Nebennieren wurde noch weiterhin von einigen Untersuchern behauptet; so von Seligsohn¹⁾. Taurin allein fand Holm²⁾.

Es sollten durch die folgenden Untersuchungen an der Hand neuerer und schärferer Methoden die Angaben der obigen Autoren über die Anwesenheit von Gallensäuren, Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren einer erneuten Prüfung unterzogen werden. Einige Angaben und Bemerkungen über die Reactionen der Gallensäuren und die angewandten Untersuchungsmethoden müssen vorausgeschickt werden. Bevor ich jedoch über diese berichte, müssen zuerst die Reactionen der Gallensäuren und die Untersuchungsmethode, welche angewandt wurden, kurz besprochen werden.

Reactionen der Gallensäuren.

Schon seit längerer Zeit ist die Pettenkofer'sche Reaction zum Nachweise von Gallensäuren bekannt. Eine genauere Beschreibung derselben ist wohl unnöthig. Bei Anwesenheit von Gallensäuren entsteht dabei eine kirschrothe Färbung, welche bald heller, bald dunkler ausfällt. Dieselbe oder wenigstens eine sehr ähnliche Reaction geben aber noch einige andere Körper, von denen besonders die Eiweissstoffe wichtig sind, ferner auch Oele, verschiedene Harze, Cholesterin, Amylalkohol, Harnstoff, höhere Fettsäuren etc.³⁾. Es sind daher solche Stoffe vor Anstellung der Reaction aus der zu untersuchenden Flüssigkeit zu entfernen.

¹⁾ S. o. «De Pigment, pathol.» Diss.

²⁾ S. o.

³⁾ Kunde, Inauguraldiss., Berlin 1850; E. Bischoff, Zeitschr. f. ration. Medicin. Bd. XXI, S. 125.

Diese Pettenkofer'sche Reaction beruht nach den Untersuchungen von Mylius¹⁾ und Udránszky²⁾ auf der Einwirkung des Furfurols. Dasselbe wird nach Döbereiner aus Zucker, Schwefelsäure und Braunstein gebildet, nach Emmet³⁾ auch aus Zucker und Schwefelsäure allein. Es wird demnach bei der Pettenkofer'schen Reaction aus dem Rohrzucker und der Schwefelsäure Furfurol abgespalten, welches mit Gallensäuren Farbproducte gibt. Löst man einen Tropfen Furfurol in 10 ccm. Wasser, so genügt ein Tropfen der Lösung, um eine Mischung von Cholsäure, Wasser und Schwefelsäure blutroth zu färben. Dieses Roth hat oft einen verschiedenen Farbenton, geht dann später in Violett und zuletzt in Blau über; diese Blaufärbung wird von einigen Autoren als entscheidend für Gallensäuren angesehen. Es gelang mir auch, die blaue Farbe sofort entstehen zu lassen, wenn ich Furfurolwasser im Ueberschuss auf eine weingeistige Lösung von Glycocholsäure und concentrirter Schwefelsäure einwirken liess. Das Furfurol wird nach Udránszky's Angabe⁴⁾ am besten in einer 0,5proc. Wasserlösung zur Reaction verwandt, da eine zu concentrirte wässerige Furfurolösung mit concentrirter Schwefelsäure auch ohne Gallensäurezusatz eine Rothfärbung gibt. Durch die Arbeit Udránszky's haben wir eine äusserst empfindliche Reaction auf Gallensäuren kennen gelernt; nach ihm schwankt die geringste Menge von Cholsäure, die mit ihrer Hilfe noch nachgewiesen werden kann, zwischen 0,000033 und 0,00005.

Die Farbenreaction der Pettenkofer'schen Reaction wurde von Bogomoloff und Schenk⁵⁾ spektroskopisch untersucht und dieselben fanden 2 charakteristische Absorptionsstreifen, einen in F, an der Grenze zwischen Grün und Blau und einen zweiten, bedeutend schwächeren bei D. Udránszky fand weiter, dass die geringste Menge von Gallensäuren, welche

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XI, S. 492.

²⁾ Ibidem, Bd. XII, S. 355: über Furfurolreactionen.

³⁾ Journal f. pract. Chemie, Bd. 12, S. 120.

⁴⁾ L. c.

⁵⁾ Maly's Jahresber. üb. d. Fortschritte d. Thierchemie, Bd. II, S. 232.

noch die Streifen liefern, 0,00005 beträgt. Es ist dabei hier zu bemerken, dass Udránszky bei seinen Versuchen reine weingeistige Cholsäurelösung anwandte, und die Gallensäuren nicht erst, wie hier, aus thierischen Geweben isoliren musste. Dass dabei ein wenn auch geringer Verlust an Gallensäuren eintreten musste, ist leicht verständlich, wie dies weiter unten bei den Vorversuchen beschrieben werden soll.

Die spektroskopische Untersuchung ist wichtig, da sie nach Schenk¹⁾ die Gallensäuren von manchen anderen Körpern unterscheiden lässt, besonders von Eiweissstoffen, welche unter den gleichen Verhältnissen sehr ähnliche Färbungen liefern können. Sie tritt jedoch an Empfindlichkeit gegen die gewöhnliche Furfurolreaction zurück, indem nur bei einer etwas stärkeren Concentration die Absorptionsstreifen hervortreten. Anfangs ist nur der breite Streifen in F sichtbar, bei zunehmender Concentration tritt auch der Streifen bei D hervor. Bei noch stärkerer Concentration ist nur noch der Streifen in D sichtbar, da von F an alles verdunkelt ist. Dasselbe geschieht, wenn die rothgefärbte Flüssigkeit, welche nur den Streifen in F gab, einige Zeit gestanden und dabei nachgedunkelt ist. Die spektroskop. Untersuchung ist mit Erfolg nur an rothgefärbten Reactionslösungen anzustellen, sind diese vollständig violett oder blau geworden, so sind keine Streifen mehr aufzufinden.

Die Furfurolreaction wurde in der Weise angestellt, dass eine geringe Menge der zu untersuchenden filtrirten alkoholischen Lösung, mit einem Tropfen Furfurolwasser versetzt, ein wenig concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt und die Mischung auf dem Wasserbade ganz wenig erwärmt ward. Ein anderer Theil der zu untersuchenden alkoholischen Lösung wurde in ein Reagenzglaschen geschüttet, ein Tropfen Furfurolwasser und ebensoviel concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt, als alkoholische Lösung genommen war. Bei Anwesenheit von Gallensäuren bildete sich an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein rother Ring und beim Umschütteln nahm die ganze Mischung die rothe Farbe an. In ein Gläschen

¹⁾ Anat. physiol. Untersuchungen. Wien 1872, S. 47.

mit parallelen Wänden gebracht, wurde die farbige Lösung dann spektroskopirt.

Untersuchungsmethode.

Es musste nun zunächst ein Gang der Untersuchung gefunden werden, mit Hilfe dessen die kleinsten Quantitäten Gallensäuren, die einem thierischen Gewebe beigemischt waren, mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Um die gleich näher zu beschreibende Methode auf ihre Genauigkeit zu prüfen, wurde eine Reihe von Vorversuchen mit Milzgewebe angestellt. Obgleich in diesem Organ die Abwesenheit von gallensauren Salzen vorausgesetzt werden konnte, so wurde diese Annahme doch noch durch einen speciellen Controllversuch als richtig erwiesen.

Die Methode war folgende:

Die Milz wurde mit Scheere und Messer möglichst zerkleinert, ein gewisses Quantum des Milzbreies abgewogen und mit einer genau gewogenen Menge eines gallensauren Salzes durch Verreiben in einer Porzellanschale gründlich vermengt. Darauf wurde das Gemisch mit warmem Wasser übergossen, nochmals verrieben und dann durch ein zusammengefaltetes Mousselintuch in eine Abdampfschale durchgepresst. Die im Tuche gebliebenen Organreste wurden wieder in die Reibschale gebracht, von neuem mit heissem Wasser übergossen, zerrieben und die Macerationsflüssigkeit durchgepresst. Dies Verfahren wurde 5 Mal wiederholt. Die auf diese Weise gewonnene Extractionsflüssigkeit war röthlich trübe, reagirte neutral, resp. amphoter, und es galt nun, aus derselben die Eiweisskörper zu entfernen, deren Anwesenheit das Anstellen der Pettenkofer'schen Reaction illusorisch gemacht hätte.

Dies geschah durch Kochen und Ansäuern. Das Enteiweissen machte oft grosse Mühe, da die abfiltrirten Proben oft noch nach langer Behandlung Spuren von Eiweiss aufwiesen. Nachdem das Eiweiss vollständig entfernt war, wurde heiss durch ein Faltenfilter filtrirt. Das Filtriren ging, falls kein Eiweiss mehr in Lösung war, rasch von Statten; das Filtrat war eine hellgelbe klare Flüssigkeit. Diese wurde nun mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaction versetzt und mit einer

Lösung von basisch essigsäurem Blei gefällt. Es entstand ein leicht gelblich gefärbter, feinflockiger Niederschlag, der sich langsam absetzte. Die überstehende Flüssigkeit wurde decantirt und ihr Ammoniak und bas. essigsäures Blei zugesetzt, um noch eine etwaige Bleifällung zu erlangen, die dann dem ersten Bleiniederschlage zugefügt wurde. Die abfiltrirten Niederschläge wurden dann mehrmals auf dem Filter mit Wasser ausgewaschen, zur Beseitigung vorhandener Farbstoffe, des Weiteren wurde dann nach der von Hoppe-Seyler¹⁾ angegebenen Methode zum Nachweis kleiner Mengen Gallensäuren verfahren. War der Bleiniederschlag nicht sehr gut mit Wasser ausgewaschen worden, so schieden sich nach der späteren Alkoholextraction beim Verdampfen des Alkohols an den Rändern der Schale bräunliche Ringe ab, die jedoch, wie dies die Versuche mit Milz ohne Gallensäurezusatz ergeben, keinen Einfluss auf die Furfurolreaction haben. Die Extraction des Bleiniederschlages mit 96% Alkohol wurde im Ganzen 4 Mal vorgenommen. Die vereinigten Filtrate mit einigen Tropfen Natr. carbon. zur Trockne verdunstet. Der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt, auf kleines Volumen eingedampft, filtrirt, aus dem Filtrate nach Abkühlen desselben die gallensauren Salze mit Aether gefällt. Dabei wurde die Flüssigkeit milchig trübe und nach 24 Stunden hatten sich die Gallensäuren, wenn sie in grösserer Menge zugesetzt waren, als harziger, gelber Niederschlag auf dem Boden des Glases gesammelt. Waren gallensaure Salze dem Milzgewebe in geringer Menge zugesetzt, so resultirte am Boden eine weisse Fällung. Ein harziger Niederschlag wurde in diesen Fällen nicht erhalten. Der überstehende Aetheralkohol wurde abfiltrirt und nach Verdunsten desselben der Rückstand mit heissem Alkohol aufgenommen, filtrirt, mit dem Filtrat die Pettenkofer'sche und die Furfurolreaction angestellt und zwar hier wie auch in allen übrigen Fällen stets beide nebeneinander. Das Hauptaugenmerk wurde natürlich auf die durch Aether hervorgebrachte Fällung gerichtet, da hauptsächlich hier die Gallensäuren sich finden. Dieselbe wurde zugleich

¹⁾ Handbuch der physiolog. u. pathol. Chemie.

mit den abfiltrirten im Aetheralkohol flottirenden Flocken, die sich manchmal darin fanden, mit warmem 95% Alkohol aufgenommen, filtrirt, das Filtrat zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen und nun die Reactionen angestellt.

Bei dieser Methode konnten nun geringe Mengen von Gallensäuren verloren gehen und es mussten speciell untersucht werden:

1. Der Organrückstand, welcher in dem Tuche zurückgeblieben war;
2. das auf dem Faltenfilter gesammelte Eiweisscoagulum, welches nach dem Enteiweissen des durchgepressten Wasserauszuges des Organes nachgeblieben war;
3. das Mousselintuch, das eventuell beim Durchpressen noch einige Spuren von Gallensäuren zurückbehalten haben konnte.

1. Der Organrückstand wurde aus dem Tuche abgeschabt, in ein Becherglas gethan, und mehrfach mit 95% Alkohol extrahirt. Die Filtrate waren Anfangs klar, trübten sich aber später durch in der Kälte ausgeschiedenes Fett. Sämmtliche Filtrate wurden vereinigt und mit A bezeichnet.

2. Das Eiweisscoagulum wurde genau in derselben Weise behandelt wie der Organrückstand, die Alkoholfiltrate, die sich auch in der Kälte ein wenig trübten, wurden sub B aufbewahrt.

3. Das Mousselintuch wurde nicht mit Alkohol, sondern mit Wasser mehrmals ausgekocht, das Filtrat enteieisst, filtrirt, das Filtrat nach Zusatz von Ammoniak mit Bleiessig gefällt und dann weiter wie die Alkoholfiltrate A, B und C behandelt. Das Eiweisscoagulum selbst mit Alkohol ausgekocht, filtrirt und den Alkoholfiltraten A und B als C. hinzugefügt. Alle 3 zusammen wurden zur Trockne verdampft, wobei eine dicke, klebrige, dunkelbräunliche Masse zurückblieb, diese dann, um Fett und Eiweiss zu entfernen, mit heissem Wasser extrahirt, filtrirt, mit Ammoniak versetzt, mit basisch essigsaurem Blei gefällt. Der Bleiniederschlag mit Alkohol ausgekocht, filtrirt, das Filtrat mit Zusatz von etwas kohlensaurem Natron zur Trockne verdampft, der Rückstand mit ab-

soludem Alkohol aufgenommen, dieser abfiltrirt, das auf kleines Volumen gebrachte und abgekühlte Filtrat mit Aether gefällt.

Somit wurden bei jedem Versuche 2 Aetherfällungen und 2 Verdunstungsrückstände des von den Aethernieder schlägen abfiltrirten Aetheralkohols erhalten. Bei den Prüfungen dieser Methode, welche in der Weise angestellt wurden, dass der Milz kleine Mengen von Gallensäuren zugefügt wurden, ergaben sich nach langem Herumprobiren einige Abänderungen als praktisch wichtig, die gleich zu beschreiben sein werden.

Wurde die Milz ohne Zusatz von Gallensäure verarbeitet, so ergab dann schliesslich die Furfurolreaction nur eine schwache bräunliche Färbung oder keine Spur der rothen charakteristischen Reaction und natürlich auch nicht das entsprechende Spectrum. Bei Hinzufügen einer geringen Menge unreiner Gallensäuren vom Hunde zur zerkleinerten Rindermilz ergab sich in der Aetherfällung ein harziger gelber Niederschlag, welcher alle Reactionen der Gallensäuren darbot.

Bei diesen Vorversuchen konnte auch die Genauigkeit der oben beschriebenen Methode geprüft werden. Das Mousselin-tuch musste 2 Mal mit Wasser ausgekocht werden. Die späteren Extraktionen ergaben keinen weiteren Gehalt an Gallensäuren.

Für den Organrückstand und die Eiweisscoagula (d. h. 1 und 2) ergab es sich als das Beste, dieselben auf dem Wasserbade zu trocknen, dann zu pulvern und nun 2 Mal mit absolutem Alkohol zu extrahiren. So blieben alle Eiweisskörper zurück. Die Fette wurden in der Weise entfernt, dass der abfiltrirte Alkohol zur Trockne verdampft, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen, filtrirt und das Filtrat dann, wie oben beschrieben, behandelt wurde.

Der zu den Extraktionen verwandte Alkohol muss nach der Angabe von Udránszky frei von Amylalkohol sein, da dieser die Furfurolreaction gibt, wie denn überhaupt Rohspirituosen Furfurol enthalten und daher mit concentrirter Schwefelsäure Farbprodukte geben.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen, wurden genaue Versuche mit abgewogenen Mengen von Milzbrei und

reinen gallensauren Salzen angestellt und zwar mit glycocholsaurem und taurocholsaurem Natron.

50,0 Milz mit 0,25 Natr. glycocholic. (d. h. 0,5%) wurde in der beschriebenen Weise behandelt. Die schliesslich erhaltenen Aetherniederschläge gaben die schönste Pettenkofer'sche und Furfurolreaction. Bei der Spectraluntersuchung zeigten sich die beiden charakteristischen Absorptionsstreifen. Nicht nur in diesem Versuche, sondern auch in den übrigen, bei denen irgendwie erheblichere Mengen gallensaurer Salze dem Milzgewebe zugesetzt waren, gab auch der Rückstand nach Verdunsten des Aetheralkohols eine schwache Furfurolreaction.

Mit gleichem positiven Erfolge wurden auch folgende Gemische untersucht:

50,0 Milz und	0,125	=	0,25%
50,0 » »	0,062	=	0,12%
50,0 » »	0,03	=	0,06%
50,0 » »	0,015	=	0,03%

Bei dem letzten Versuche und den folgenden ergab die Furfurolreaction nicht sofort das charakteristische Spectrum. Die Linie F trat zwar deutlich hervor, jedoch nicht die bei D. Es dauerte jedoch nur kurze Zeit, bis auch der zweite Streifen erschien, indem die Farbenreaction bald nachdunkelte. Noch mehr Interesse haben die letzten Versuche mit 3 mgr., 1 mgr. und 0,5 mgr. Natr. glycocholic. je zu 50,0 Milz:

a) 50,0 Milz und 0,003 Natr. glycochol. = 0,006%.

Auch hier war deutliche Furfurolreaction zu erzielen; das Spectrum zeigte jedoch nur den Streifen bei F und erst nach 24 stündigem Stehen der zum Spectroscopiren verwendeten rothen Mischung trat ein schwacher Streifen bei D auf. Es muss hier nochmals betont werden, dass der Zusatz des Furfurolwassers vorsichtig zu geschehen hat, da bei zu viel Furfurol bald vollständige Violettfärbung eintritt, bei welcher kein Spectrum aufzufinden ist.

b) 50,0 Milz und 0,001 Natr. glycocholic. = 0,012%.

Auch hier trat schliesslich deutliche, wenn auch nicht intensive Furfurolreaction auf, ein charakteristisches Spectrum konnte jedoch bei diesem Versuche nicht mehr wahrgenommen werden, was bei diesem Verdünnungsgrade auch nicht wunder nehmen kann. Udránszky hat bei sehr geringen Gallensäuremengen gleichfalls zwar Reaction, aber kein Spectrum mehr erhalten. Nach ihm ist die Grenze für den spectroscopischen Nachweis 0,00005.

c) 50,0 Milz und 0,0005 Natr. glycocholic. = 0,001 ‰.

Auch hier war schwache, aber deutliche Reaction, jedoch kein Spectrum, zu erhalten.

Die Versuche mit Natr. taurocholicum verliefen ganz analog.

Die beiden Salze machen keinen Unterschied in der Pettenkofer'schen und in der Furfurolreaction. Das taurocholsaure Natron lässt sich ebenso sicher dem Gemische entziehen und nachweisen wie das glycochols. Natron.

Es kamen zur Untersuchung:

50,0	Milz	und	0,125	Natr. taurocholic.
50,0	»	»	0,062	»
50,0	»	»	0,03	»
50,0	»	»	0,015	»
50,0	»	»	0,003	»
50,0	»	»	0,001	»
50,0	»	»	0,0005	»

Da die Versuche genau so verliefen, wie mit Natr. glycocholicum, kann die nähere Beschreibung der Resultate unterlassen werden. Es schien, als ob beim Nachdunkeln hier der 2. Streifen bei D rascher auftrat als beim Natr. glycocholic., jedoch kann das nicht bestimmt behauptet werden.

Wie aus diesen Versuchen zu ersehen ist, besitzen wir in der Furfurolreaction ein sehr empfindliches Mittel zum Nachweis von Gallensäuren und zugleich zeigt die hier befolgte Methode, dass wir mit derselben noch äusserst geringe Mengen von Gallensäuren thierischen Geweben entziehen und deutlich nachweisen können. Wenn Mylius und Udránszky als die geringste Menge noch nachweisbarer Gallensäuren die Zahl 0,000033 angeben, so haben in unseren Versuchen beim Nachweis von noch 0,0005 keine zu grossen Verluste stattgefunden, die bei einer immerhin umständlichen Isolirung wohl kaum zu vermeiden sind, während jene Autoren mit reinen weingeistigen Cholsäurelösungen arbeiteten.

Versuche mit Nebennieren.

Benutzt wurden zu diesen Untersuchungen die Nebennieren des Menschen, des Hundes und namentlich die des Rindes, welche letztere in grösserer Menge zu erhalten waren. Da der Nachweis von Gallensäuren in denselben nicht gelang, die Resultate also

negative sind, so will ich mich hier kurz fassen. Gearbeitet wurde genau nach der früheren Methode, deren Ausführung bei den Nebennieren bedeutend leichter ist, als sie bei den Vorversuchen mit der Milz war, da die Eiweissmengen, die hier fortzuschaffen sind, viel geringer sind, als bei der blutreichen Milz.

Was die Versuche mit der Nebenniere des Menschen anbetrifft, so stand leider wenig Material zur Verfügung und es ist durch den negativen Ausfall der Untersuchungen hier die Abwesenheit von Gallensäuren wohl nicht sicher bewiesen, wenngleich sehr wahrscheinlich gemacht.

Dagegen waren grössere Quantitäten Hunde- und Rindernebnieren zu erhalten. Da nur wenige Nebennieren vom Hunde auf einmal zu bekommen waren, so mussten, um mehr Versuchsmaterial zu haben, dieselben in eine Form gebracht werden, bei welcher Fäulniss und eventueller Gallensäureverlust unmöglich war. Desshalb wurden die Bleiniederschläge gesammelt, die Organrückstände und Eiweisscoagula in absolutem Alkohol aufbewahrt, bis eine genügende Menge derselben vorhanden war, um die Versuche anzustellen. Wie gesagt, fielen dieselben negativ aus und somit kann die Anwesenheit von Gallensäuren in den Nebennieren der Carnivoren bestritten werden.

Auch beim Verarbeiten von 50,0 Nebennieren des Rindes wurde keine Furfuroreaction erhalten, sondern nur eine hellbräunliche Flüssigkeit, deren Farbe lediglich durch die Einwirkung der concentrirten Schwefelsäure hervorgebracht sein konnte. Da die Quantität von 50,0 Nebennieren vielleicht noch zu gering war, wurde noch je ein Versuch mit 100,0 und 200,0, jedoch mit dem früheren Erfolge gemacht.

Es kann deshalb, in Anbetracht der Empfindlichkeit der Reaction und gestützt auf die Vorversuche, welche noch einen Gallensäurenachweis von 0,001% ermöglichten, die Ansicht der genannten Autoren über das Vorkommen von Gallensäuren nicht acceptirt, sondern die Behauptung aufgestellt werden, dass weder Carni- noch Herbivoren in ihren Nebennieren Gallensäuren enthalten.

Selbst wenn bei diesen Versuchen eine Rothfärbung aufgetreten wäre, die aber thatsächlich fehlte, so könnte man

daraus nicht ohne Weiteres auf die Gegenwart von Gallensäuren schliessen, da auch das in den Nebennieren enthaltene Chromogen, welches rothe Farbproducte liefert, die Reaction hätte vortäuschen können. Allerdings hätte es sich auch nur um ganz geringe Mengen dieses Chromogens handeln können, da der rothe Farbstoff desselben in Alkohol unlöslich ist¹⁾. Dass Virchow nach Eindampfen des wässrigen Extractes durch Zucker und Schwefelsäure ein positives Resultat erhielt, ist leicht verständlich, da er von Eliminiren der Fette und Eiweisskörper nicht redet und somit wahrscheinlich diese die Reaction hervorgerufen haben. Cloëz und Vulpian geben uns keine Reaction der Gallensäuren an, die Pettenkofer'sche ist bei ihnen gar nicht erwähnt, auch für das von ihnen gefundene Taurin geben sie uns keinen Beweis. Auch Holm sagt nur kurz: «Das Filtrat lieferte Taurin».

Es darf hier erwähnt werden, dass bei diesen Versuchen auch der schön roth gefärbte Farbstoff der Nebennieren auftrat; beim Alkalisiren des enteweissten wässrigen Extractes ging dessen hellgelbe Farbe in roth über. Wurde nun mit Bleiessig gefällt und der Niederschlag abfiltrirt, so war das klare Filtrat schön roth gefärbt; durch den Spectralapparat betrachtet zeigten sich jedoch keine Streifen und es hat somit diese Rothfärbung nichts Gemeinsames mit der Färbung der Gallensäuren durch Furfurol.

Untersuchungen über Hippursäure und Benzoësäure.

Bei den Untersuchungen auf die Gegenwart von Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren kam die Methode von Schmiedeberg und Bunge²⁾ zur Anwendung, welche bis jetzt als die sicherste und genaueste anzusehen ist.

100 gr. vollständig frische Nebennieren vom Rinde wurden mit Scheere und Hackmesser so fein als möglich zerkleinert, mit Wasser von 45° C. mehrere Male extrahirt, durch ein Mousselintuch gepresst. Eine höhere Temperatur des Wassers

¹⁾ Hoppe-Seyler, Lehrbuch d. physiol. Chemie und Holm: Journal für pract. Chemie, Bd. C.

²⁾ Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmak., Bd. VI, S. 233.

war zu vermeiden, um nicht durch Aufnahme leimartiger Substanzen gestört zu werden, vor denen Schmiedeberg und Bunge warnen. Das wässrige Extract wurde auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen eingedampft und enteiweisst. Dass dabei vorhandene Hippursäure nicht Zersetzungen erleidet, haben die genannten Autoren festgestellt. Das Eiweiss wurde dann abfiltrirt, das Filtrat, welches eine hellgelbe Farbe hatte, mit einer Lösung von Natr. carbonic. alkalisch gemacht. Auch hier trat durch das Alkali dieselbe Rothfärbung der Flüssigkeit ein, die früher bei Untersuchung der Nebennieren auf Gallensäuren beschrieben ist.

Das alkalisch gemachte Filtrat wurde auf dem Dampfbade bis zur Syrupconsistenz eingeengt und weiterhin nach der Angabe von Bunge und Schmiedeberg verfahren. Also Aufnahme des Syrups mit viel absolutem Alkohol, Abfiltriren desselben, Eindampfen des alkohol. Filtrats, wobei allmählig Wasser zugesetzt wurde, bis aller Alkohol entwichen war. Diese wässrige Lösung, welche, stark mit Salzsäure angesäuert, nur eine sehr geringe Trübung gab, wurde dann filtrirt. Das saure Filtrat wurde mit Essigäther behandelt, dieser verdunstet, der Rückstand mit Petroleumäther behandelt, dieser abgossen und zum Verdunsten gestellt, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung, welche auf Hippursäure untersucht werden sollte, gab nach tagelangem Stehen im Exsiccator keine Krystalle, obgleich nur wenige Tropfen nachgeblieben waren. Deshalb wurde der Weg eingeschlagen, auf welchem Bunge und Schmiedeberg die kleinsten Hippursäuremengen gefunden hatten.

Die wenigen Tropfen, die unter dem Exsiccator keine Krystallisation zeigen wollten, wurden mit Wasser verdünnt, mit etwas Zinkoxyd versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt. Was sich von Zinksalzen gebildet und gelöst hatte, wurde abfiltrirt und das Filtrat beinahe bis zur Trockne eingedampft. Schmiedeberg und Bunge halten die Anwesenheit von Milchsäure, neben anderen organischen Säuren, als hauptsächlichstes Hinderniss für die Ausscheidung sehr kleiner Hippursäuremengen.

Es wurde deshalb das eingedampfte Filtrat mit Alkohol aufgenommen und filtrirt. Das in Alkohol unlösliche milchsaure Zink bleibt hierbei zurück, während das hippursäure Zink in Lösung geht.

Die alkoholische Lösung wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in etwas Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und mit Essigäther ausgeschüttelt. Der von der sauren Lösung getrennte Essigäther wurde mit Wasser gewaschen und verdunstet, wobei sich am Boden des Glasschälchens einige helle Ringe absetzten. Der Rückstand wurde mit einigen Tropfen warmen Wassers aufgenommen. Nach dem langsamen Verdunsten desselben konnte auch mikroskopisch keine Spur von Hippursäurekrystallen aufgefunden werden.

Dass die Methode im Stande ist, auch sehr geringe Mengen Hippursäure, vermengt mit thierischen Geweben, nachzuweisen, zeigten uns Schmiedeberg und Bunge, welche 0,01 gr. Hippursäure zu einem Brei von 10 grossen, in kleine Stücke zertheilten Fröschen setzten; sie erhielten 0,0045 gr. reine Hippursäurekrystalle wieder.

Da aus 100 gr. Nebennieren auch nicht eine Spur Hippursäure erhalten wurde und ein nochmaliger Versuch mit 200 gr. ebenso resultatlos blieb, so darf aus diesen Untersuchungen im Gegensatz zu Cloëz und Vulpian der Schluss gezogen werden, dass die Nebennieren keine Hippursäure enthalten.

Um auf Benzoësäure zu untersuchen, wurde der Rückstand, welchen man nach obiger Methode mit der Extraction von Essigäther erhielt, mit Petroleumäther gewaschen und dieser zur Trockne verdunstet. Petroleumäther trennt Fett und Benzoësäure von Hippursäure. Der Rückstand wurde nach Verdunsten des Petroleumäthers mit wenig Wasser aufgenommen, das Fett abfiltrirt, das wässrige Filtrat bei Zimmertemperatur der Verdunstung überlassen. Im Rückstande konnte keine Benzoësäure nachgewiesen werden. Das Ergebniss dieser Untersuchungen kann daher kurz in den Satz zusammengefasst werden:

Die Nebennieren enthalten weder Gallensäuren noch Hippursäure, noch Benzoësäure.
