

Zur Kenntnis des Harns und des Stoffwechsels der Herbivoren. — Vorkommen von Allantoin. — Indikanbestimmung.

Von
E. Salkowski.

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

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juni 1904.)

I.

Vor einiger Zeit habe ich gelegentlich darauf aufmerksam gemacht, daß Harn, die man längere Zeit mit Chloroformzusatz aufbewahrt hat, auffallend wenig Harnsäure enthalten, und die Vermutung ausgesprochen, daß die Harnsäure unter Bildung von Oxalsäure oxydiert sein könnte.

Luzzatto ¹⁾ hat dann an einem Hundeharn eine starke Steigerung des Oxalsäuregehaltes direkt festgestellt. Ein Hundeharn, der schon längere Zeit mit Chloroform versetzt gestanden hatte, enthielt 0,0647 g Oxalsäure im Liter; nachdem er dann weitere 3 Monate gestanden hatte, 0,1385 g, der Oxalsäuregehalt hatte sich also verdoppelt.

Ein Rinderharn (Kuhharn), welcher mehrere Jahre, mit Chloroform konserviert, gestanden hatte, gab mir Gelegenheit, eine ganz ungewöhnlich große Menge Oxalsäure im Sediment festzustellen. Der Harn — es waren etwa 5 Liter — war zu anderen Zwecken von einem reichlichen Bodensatz, der sich allmählich gebildet hatte, abfiltriert worden. Da die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß das Sediment anscheinend größtenteils aus oxalsaurem Kalk bestand, sah ich mich veranlaßt, die Quantität der Oxalsäure in demselben zu bestimmen. Zu dem Zweck wurde der Niederschlag nach dem Auswaschen in verdünnter Salzsäure gelöst, nachgewaschen und das klare Filtrat durch Wasserzusatz auf das Volumen von 500 ccm gebracht.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 234.

1. 50 ccm wurden mit Ammoniak alkalisiert, mit Essigsäure ziemlich stark angesäuert: der Niederschlag, gesammelt, gewaschen, gegläht, lieferte 0,1124 CaO. Dasselbe war frei von Schwefelsäure und Phosphorsäure.

2. 25 ccm, ebenso behandelt, gaben $0,0572 \text{ CaO} \times 2 = 0,1144 \text{ CaO}$. Im Mittel lieferten also 50 ccm 0,1134 CaO. Daraus berechnet sich für das ganze aus 5 Litern stammende Sediment 1,822 g wasserfreie Oxalsäure, in Form von oxalsaurem Kalk abgeschieden, oder 0,3644 pro Liter.

In Anbetracht dieses ungewöhnlich hohen Befundes schien es mir wünschenswert, mit aller Bestimmtheit den Nachweis zu führen, daß hier wirklich Oxalsäure vorlag.

Zu dem Zweck wurden die restierenden 425 ccm der salzsauren Lösung wiederholt mit Äther geschüttelt und der beim Abdestillieren und Verdunsten des Ätherauszuges bleibende Rückstand umkristallisiert. Es ergab sich so 0,2396 g erste und 0,5822 g zweite Fraktion.

Zur Analyse wurde die erste Fraktion verwendet, nachdem sie zur Entwässerung längere Zeit bei 100° getrocknet war. Dabei ging leider infolge zu hohen Ansteigens der Temperatur ein großer Teil durch Sublimation verloren.

0,1107 g gaben 0,1067 g CO_2 und 0,0249 g H_2O

	Berechnet	Gefunden
C	26,67%	26,30%
H	2,22%	2,49%

Die zweite Fraktion nebst kleinen Resten der ersten wurde in wenig Wasser gelöst und mit Ammoniak versetzt, das kristallinisch ausgeschiedene Ammoniumoxalat abfiltriert und abgepreßt.

0,3417 g lufttrocken wurden mit Natronlauge destilliert, das Ammoniak in 10 ccm Normalschwefelsäure aufgefangen. Beim Zurücktitrieren wurden gebraucht 25,8 ccm $\frac{1}{5}$ Normal-säure, also waren gebunden $24,2 \frac{1}{5}$ Säure. Daraus berechnet sich ein N-Gehalt von 19,80%; oxalsaures Ammon mit 1 Mol. Krystallwasser erfordert 19,72%.

Im Destillationskolben hatte sich schwerlösliches Natriumoxalat ausgeschieden. Selbstverständlich wurde auch die Reaktion der Säure mit Calciumsalzen festgestellt.

Die im Harn etwa noch gelöst vorhandene Oxalsäure konnte leider nicht bestimmt werden, da der Harn schon anderweitig verbraucht war.

Wenn sich nun auch häufig, aber durchaus nicht immer, in dem Harn der Pflanzenfresser ein Sediment findet, in dem nach der mikroskopischen Untersuchung oxalsaurer Kalk anzunehmen ist, so ist doch selbstverständlich nicht daran zu denken, daß die ganze Quantität Oxalsäure im Harn bereits präformiert war. Der Sicherheit halber aber wurden doch noch 2 Rinderharnen auf Oxalsäure untersucht.

Harn I stammte von verschiedenen Kühen. Er war fast ganz klar, von ganz schwach alkalischer Reaktion, von lichtbräunlicher Farbe. Spez. Gew. 1024 N-Gehalt = 0,75%.

Harn II stammte von einer Kuh. Äußere Beschaffenheit wie bei I, Reaktion neutral. Spez. Gew. 1021 N-Gehalt = 0,685%.

1. 250 ccm von Harn I wurden unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure auf dem Wasserbad auf ein geringes Volumen eingedampft. Bei Zusatz von ca. 20 ccm Salzsäure von 1,124 D nach dem Erkalten erstarrte der Rückstand zu einem Brei von Hippursäure. Nach ca. 24 stündigem Stehen wurde soviel Wasser hinzugesetzt, daß ein dünner Brei entstand. Die Hippursäure abfiltriert und nachgewaschen, das Filtrat 5 mal mit einem Gemisch von 9 Vol. Äther und 1 Vol. Alkohol ausgeschüttelt und im übrigen so verfahren, wie ich es in Bd. XXIX, S. 437 dieser Zeitschrift angegeben habe. Nach 24 stündigem Stehen nach Zusatz von CaCl_2 , NH_3 und $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ hatte sich nur ein Anflug von lichtbräunlicher Farbe am Boden des Bechergläschens gebildet. Derselbe wurde auf einem Filter gesammelt, gewaschen, auf dem Filter mit warmer verdünnter Salzsäure behandelt (unter mehrmaligem Zurückgießen der Salzsäure). Das Filtrat lieferte mit NH_3 und etwas Essigsäure versetzt eine geringe Quantität oxalsauren Kalk, der 0,0013 CaO gab = 0,0084 Oxalsäure im Liter.

2. 250 ccm Harn II, ebenso behandelt, gab gleichfalls eine Spur oxalsauren Kalk = 0,0009 CaO = 0,0058 Oxalsäure im Liter.

3. 500 ccm Harn sollten nach dem Verfahren von Auten-

rieth und Barth¹⁾ untersucht werden, es entstand jedoch nach dem Zusatz von CaCl_2 und NH_3 überhaupt kein merklicher Niederschlag, weil der Harn zu phosphorsäurearm war. Um das Verfahren ausführbar zu machen, wurden 500 ccm mit ca. 2 g Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$) und dann mit CaCl_2 und NH_3 versetzt. In dem nach 24 Stunden verarbeiteten Niederschlag war Oxalsäure nicht nachweisbar. Es resultierte schließlich 0,6 mg Rückstand, der aus Ferriphosphat bestand.

Danach kann man wohl bestimmt annehmen, daß die Oxalsäure in dem alten Harn nicht präformiert, sondern beim Stehen entstanden war.

In analytischer Beziehung folgt aus dem Mitgeteilten, daß es nicht angängig ist, Harnsäure oder Oxalsäure in lange aufbewahrten Harnen zu bestimmen. Das wird ja auch schwerlich jemand von vornherein tun, wohl aber könnte man auf den Gedanken kommen, früher ausgeführte Bestimmungen noch einmal an konserviertem Material zu kontrollieren. Das geht also nicht an.

Es fragt sich nun, woraus die Oxalsäure im vorliegenden Fall entstanden ist. An die Harnsäure als Muttersubstanz war kaum zu denken, da der Rinderharn sehr arm an Harnsäure ist. Mittelbach²⁾ fand in demselben:

0,091 — 0,453 — 0,191 — 0,196 — 0,333 — 0,088 g im Liter.
Ich selbst fand in Harn I 0,027%, in Harn II 0,021% Harnsäure.

Da der alte Harn aus derselben Quelle stammte wie die beiden Harn I und II und wie diese von Milchkühen mit Trockenfütterung herrührte, so darf man wohl annehmen, daß der Harnsäuregehalt annähernd derselbe gewesen sein wird.

An dem alten Rinderharn war nun noch eine andere Abweichung konstatiert worden. Während frischer Rinderharn in der Regel direkt Reaktionen auf Skatolkarbonsäure gibt,³⁾ sicher im Rückstand des Ätherauszuges aus dem angesäuerten Harn — allerdings an Intensität wechselnd — war in dem alten

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 327.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 465.

³⁾ Ich halte es für sehr wohl möglich, daß auch das Urorosein ein aus der Skatolkarbonsäure stammender Farbstoff ist.

Harn keine Reaktion auf Skatolkarbonsäure zu erhalten, auch nicht im Ätherauszug.

Die Annahme, daß die Skatolkarbonsäure zu Oxalsäure oxydiert sei, ist nun nicht sehr wahrscheinlich, aber doch nicht ausgeschlossen, wenn man sich erinnert, mit welcher Leichtigkeit manche aromatische Substanzen, wie das Phenol, in wässriger Lösung durch Kaliumpermanganat zu Oxalsäure oxydiert werden. Jedenfalls ist es doch das Nächstliegende, zwei Erscheinungen, die gleichzeitig auftreten, in ursächlichen Zusammenhang zu bringen. Ist aber die Quantität der Skatolkarbonsäure im Rinderharn so groß, daß man überhaupt an diese Möglichkeit denken kann? Diese Frage mußte zuerst entschieden werden. Andererseits kam mir die Idee, ob nicht vielleicht, wenn die Harnsäure selbst die Quelle nicht war, ein der Harnsäure nahestehender Körper, das Allantoin, die Quelle sein könnte. Allerdings ist das Allantoin bisher nicht im Rinderharn gefunden, konnte es aber nicht ebenso übersehen sein, wie lange Jahre im Hundeharn?

Um über diese Fragen ins Klare zu kommen, wurde zunächst 1 l Rinderharn I auf dem Wasserbad möglichst weit eingedampft und dann mehrere Tage stehen gelassen. Nach dieser Zeit fand ich den Sirup zu einem Brei von kleinen Kristallwarzen erstarrt, welche den Eindruck machten, als ob sie einheitlicher Natur seien. Das war nun, wie sich bald ergab, nicht der Fall, es waren vielmehr im wesentlichen — abgesehen von anorganischen Beimischungen — zwei organische Körper von sehr verschiedener Löslichkeit vorhanden, deren Trennung keine Schwierigkeit machte. Der kristallinische Brei wurde mit wenig kaltem Wasser angerührt, auf dem Nutschenfilter abgesaugt und mit kleinen Portionen Wasser gewaschen, dann in einen Kolben übertragen und mit Wasser zum Sieden erhitzt, heiß filtriert. Dabei blieb etwas schleimige Substanz ungelöst zurück. Aus dem etwas eingeeengten Filtrat schieden sich beim Stehen bis zum nächsten Tage Kristalldrüsen aus, deren Aussehen an Allantoin erinnerte. Gleichzeitig hatte sich die Flüssigkeit getrübt und es hatte sich auch etwas pulveriger Niederschlag auf den Kristalldrüsen ausgeschieden. Dieser Niederschlag be-

stand aus harnsauren Salzen und Calciumsulfat. Die Kristalldrusen wurden aus der Flüssigkeit herausgenommen und durch Abspülen mit Wasser oberflächlich gereinigt. Schon nach einmaligem Umkristallisieren ohne Anwendung von Knochenkohle war der fragliche Körper fast ganz aschefrei und erschien hinreichend rein zur Analyse. Es wurde zunächst eine N-Bestimmung nach Kjeldahl gemacht.

0,2930 g unter Zusatz von CuSO_4 5 Stunden lang mit H_2SO_4 erhitzt (ohne Zusatz von Kaliumpermanganat) erforderten 36,8 ccm $\frac{1}{5}$ Normal-säure = 0,10314 g N = 35,15%. Berechnet für Allantoin: 35,44%.

Zur Sicherheit wurde die Substanz noch einmal unter Anwendung von etwas Knochenkohle aus heißem Wasser umkristallisiert und erschien nun blendend weiß in schön ausgebildeten Kristallen.

0,1707 g gaben 0,1890 g CO_2 und 0,0753 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$		Gefunden
C	30,38%	30,22%
H	3,78%	4,01%

Es lag also in der Tat Allantoin vor. Damit stimmte auch die Bildung von Oxalsäure durch Einwirkung von Natronlauge und die Fällbarkeit durch ganz schwach ammoniakalische Silberlösung überein.

Die Oxalsäurereaktion gelingt nach meinen Erfahrungen leicht und sicher, wenn man ein Pröbchen Allantoin im Reagensglas kurze Zeit — etwa 1—2 Minuten — mit Natronlauge von ca. 15% NaHO zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten mit Essigsäure schwach ansäuert, dann CaCl_2 - oder CaSO_4 -Lösung hinzusetzt. Zu starke Natronlauge und zu langes Erhitzen ist zu vermeiden, da sich dann beim Ansäuern Kieselsäure ausscheidet.

Die Silberreaktion auf Allantoin gehört bekanntlich zu den allerdiffizilsten. Eine Spur Ammoniak zuviel verhindert das Eintreten der Fällung. Poduschka und J. Pohl¹⁾ haben vorgeschlagen, die Reaktion so anzustellen, daß man nach dem Zusatz des Reagens noch Silbernitratlösung hinzufügt. Das Verfahren ist sehr gut, könnte aber, wenn man es zur quantitativen Bestimmung braucht, wie Poduschka es tut, unter Umständen zu einem fehlerhaften Plus von Allantoin führen. Eine schwach

¹⁾ Zeitschr. f. exp. Pathol., Bd. 44, S. 59.

ammoniakalische Silberlösung gibt natürlich bei erneutem Zusatz von Silbernitrat einen bräunlichen Niederschlag von Silberoxyd. Es ist also Vorsicht in dieser Richtung geboten: der Niederschlag muß von rein weißer Farbe sein.

Die Darstellung des Allantoins in der angegebenen Weise wurde noch 2 mal mit je 1 Liter Harn I wiederholt und verlief stets wie oben beschrieben. Die Quantität des Allantoins ist nicht ganz unerheblich. In einem Falle, in dem Verluste möglichst vermieden wurden, erhielt ich aus 1 Liter Harn I 0,775 g trockenes analysenreines Allantoin. In Wirklichkeit wird man den Gehalt an Allantoin wohl auf 1 g im Liter veranschlagen können.

Der Harn I stammte, wie gesagt, von verschiedenen Kühen. Man könnte nun ja allenfalls denken, daß unter diesen nur ein abnormer Allantoinproduzent gewesen sein könnte. Das ist zwar aus dem Grunde unwahrscheinlich, weil diese eine Kuh dann eine ganz außerordentlich große Quantität Allantoin ausgeschieden haben müßte, der Sicherheit wegen wurde aber doch noch der von einer Kuh stammende Harn II untersucht und darin gleichfalls Allantoin gefunden.

Danach ist die alte Angabe, daß nur der Harn von Saugkälbern Allantoin enthält und zwar darum, weil diese rein animalische Nahrung erhielten, zu berichtigen. Allantoin ist vielmehr ein normaler Bestandteil des Kuhharns. Ob es konstant darin vorkommt oder nur bei einer bestimmten Fütterung — sie bestand im vorliegenden Fall aus Haferschrot, Kleie, Biertrebern und Heu — oder ob es vielleicht nur bei Milchkühen vorkommt, nicht bei männlichen Rindern, dieses alles müßte durch besondere Untersuchungen festgestellt werden. Ebenso müßten auch der Pferdeharn und die Kuhmilch auf Allantoin untersucht werden.

Es ist nun sehr wahrscheinlich, daß sich die Oxalsäure aus dem Allantoin bildet, streng genommen hätte auch das allmähliche Verschwinden des Allantoins unter Auftreten von Oxalsäure festgestellt werden müssen. Da die Bildung der Oxalsäure aber äußerst langsam erfolgt, so ist diese Forderung nicht leicht zu erfüllen, einstweilen hielt ich den Zusammenhang für hinreichend wahrscheinlich, um die Untersuchung der

Verhältnisse der Skatolkarbonsäure vorläufig aufzugeben. Es ist wohl möglich, daß die Bildung von Oxalsäure aus Allantoin durch ein im Harn enthaltenes Ferment bewirkt wird, der Nachweis wegen des langsamen Verlaufs der Reaktion aber kaum zu führen.

Was war nun der zweite Körper, der sich aus dem eingedampften Harn kristallinisch abgeschieden hatte? Wie vor auszusehen, ergab sich alsbald, daß es sich um ein hippursaures Salz handelte. Zur Gewinnung desselben wurde das Filtrat vom Allantoin eingedampft und die beim Stehenlassen auskristallisierten Substanzen durch Absaugen auf Tonplatten und mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Anwendung von etwas Knochenkohle gereinigt. Beim Umkristallisieren blieb Calciumsulfat zurück, es gelang jedoch nicht, dieses völlig abzutrennen. Da es nicht lohnte, hierauf noch viel Zeit, möglicherweise ohne Erfolg, zu verwenden, wurde auf völlige Reinheit der Verbindung verzichtet. Daß es sich wirklich um hippursauren Kalk handelte, zeigten, abgesehen von der Ausscheidung von Hippursäure aus der Lösung beim Ansäuern mit Salzsäure, die analytischen Ergebnisse.

1. 0,4237 g der völlig lufttrockenen Substanz verloren bei anhaltenden Trocknen bei 100–105° 0,0511 g = 12,06%, die Formel $(C_9H_5NO_3)_2Ca + 3H_2O$ erfordert 12,00%;

2. 0,3526 g wasserfrei gaben 0,0528 g CaO = 10,69% Ca, erfordert 10,10%. Das CaO enthält etwas $CaSO_4$ beigemischt.

Aus eingedampftem Rinderharn kristallisieren also Allantoin und hippursaurer Kalk direkt aus. Ein Auskristallisieren von kresolschwefelsaurem Kali, wie es nach Baumann und Herter¹⁾ — ohne nähere Angaben — an Pferdeharn zu beobachten ist, habe ich am Rinderharn nicht konstatieren können. Bei dem geringen Kresolgehalt (siehe weiter unten) ist das sehr erklärlich.

II.

Vor längerer Zeit habe ich²⁾ eine Anzahl quantitative Bestimmungen an einem Pferdeharn veröffentlicht. Das in

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 247.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 241.

verschiedenen Beziehungen abweichende Verhalten des Rinderharns gegenüber dem Pferdeharn ließ es nun wünschenswert erscheinen, über die quantitativen Verhältnisse des Rinderharns gleichfalls Aufschluß zu erhalten.

Da die Analyse des Pferdeharns lange zurückliegt, sei es mir gestattet, die Zahlen zur besseren Vergleichung mit den von Kuhharn I erhaltenen zu wiederholen. Die nachfolgende Tabelle enthält die gefundenen Zahlenwerte in Gramm für 1 Liter.

1 Liter enthält Gramme	Pferdeharn	Rinderharn
Trockenrückstand	120,8	56,44
Wasser	879,2	943,56
Organische Substanz	96,38	39,19
Anorganische Substanz	24,42	17,25
Gesamt-N	30,92	7,50
Ammoniak	0,176	nicht bestimmt
Kalk	2,78	0,796
Magnesia	nicht bestimmt	0,936
Chlornatrium	13,2	12,35
Phosphorsäure	0,107	0,021 (?)
Präformierte Schwefelsäure	nicht bestimmt	0,806
Ätherschwefelsäure	nicht bestimmt	0,779
Gesamtschwefelsäure	4,72	1,585
Schwefel in neutraler Form	0,617	0,149
Schwefel als Schwefelsäure	1,892	0,635
Harnsäure	Spuren	0,266
Oxalsäure	nicht bestimmt	0,008
Hippursäure	7,59	11,85
Phenol resp. Kresol	1,19	0,153
Indoxyl	nicht bestimmt	0,028 ¹⁾
Neutraler Schwefel : saurem	1 : 3,2	1 : 4,3
Gesamtschwefel : N	1 : 12,3	1 : 8,5
Neutraler Schwefel : N	1 : 50,1	1 : 50,3
Phenol : N	1 : 26	1 : 49

¹⁾ resp. mit Korrektur nach Ellinger 0,033.

Hierzu sei folgendes bemerkt:

1. **Trockenrückstand und Asche.** — Die Bestimmung des Trockenrückstandes geschah wie beim Pferdeharn durch Eintrocknen von 5 ccm Harn im evakuierten Exsikkator auf Sand. Die Bestimmung des Aschegehaltes in der üblichen Weise in 10 ccm Harn.

Anfangs versuchte ich hierzu ein anderes Verfahren, das sehr bequem erschien, sich schließlich aber doch nicht einwandfrei erwies. In eine Platinschale wurde 2.5—3 g geglähte Kieselsäure gebracht, nochmals etwa eine halbe Stunde gegläht, dann mit der Schale gewogen. Nunmehr wurden 5 oder 10 ccm Harn aufgetropft, auf dem Wasserbad getrocknet, dann so lange gegläht, bis die Kieselsäure wieder weiß erschien, gewogen. Die Gewichtszunahme wurde als Asche betrachtet.

Das Verfahren ist sehr bequem, da es gar keine Ueberwachung erfordert, während die Veraschung von Harnrückständen bekanntlich recht schwierig ist und unausgesetzte Ueberwachung erheischt. In der Folge erwies sich das Verfahren aber als unanwendbar, da die Werte zu niedrig ausfielen, außerdem Doppelbestimmungen nicht übereinstimmten. Im vorliegenden Fall ergab sich statt 17,25 nur 11,38 und 12,52 g Asche.

Die Ursache dieser Erscheinung ist unzweifelhaft die Verflüchtigung von Chloriden beim Glühen. In Rose-Finkener, Bd. II, S. 639 (1871), findet sich die Angabe, daß Kieselsäure das hygroskopische Wasser erst vor dem Gebläse vollständig abgibt, nicht beim Glühen mit dem gewöhnlichen Bunsenschen Brenner. Das habe ich allerdings nicht bestätigen können. 2½—3 g Kieselsäure wurden bei etwa halbstündigem Erhitzen mit einem guten Bunsenbrenner wasserfrei, so daß nachfolgendes viertelstündiges schärfstes Glühen vor dem Gebläse keine weitere Gewichtsabnahme bewirkte, als höchstens einige Zehntelmilligramme. Das läßt sich allerdings durch Wägen der Schale direkt nicht entscheiden, da die Kieselsäure äußerst hygroskopisch ist und auf der Wage fortdauernd an Gewicht zunimmt. Man muß vielmehr die Platinschale in ein Wägeschälchen setzen und das ganze System wägen. Gar zu große Ansprüche an die Genauigkeit darf man freilich auch dann nicht machen, da größere bei 100° getrocknete Glasgefäße beim Stehen auf der Wage immer etwas Wasser auf ihrer Oberfläche kondensieren und allmählich um Zehntelmilligramme schwerer werden.

Wenn also ein Glühen vor dem Gebläse auch nicht erforderlich ist, so führt doch schon halbstündiges Glühen auf dem Bunsenbrenner zu sehr merklicher Verflüchtigung von Chloriden und die Sachlage wird durch einen anderen Umstand noch ungünstiger. Übergießt man die gewogene Kieselsäure mit Wasser, trocknet ein und erhitzt, so wird nunmehr das frühere Gewicht keineswegs in einer halben Stunde erreicht, sondern erfordert noch längere Erhitzung.

Das Verfahren, das durch seine Bequemlichkeit sehr besticht, ist also leider nicht oder höchstens in ganz besonderen Fällen, in denen Chloride kaum vorhanden sind, anwendbar. Vielleicht würde sich die Kieselsäure durch andere geeignete Verbindungen ersetzen lassen.

2. Gesamt-N. — Beim Erhitzen mit Schwefelsäure unter Zusatz von Kupfersulfat verhielt sich der Harn wesentlich anders, wie menschlicher oder Hundeharn. Während bei diesen meistens 1 Stunde reichlich ausreicht, ist beim Rinderharn 3—4stündiges Erhitzen, auch wohl noch mehr erforderlich, augenscheinlich wegen des hohen Gehaltes an Hippursäure, welche nur sehr langsam zersetzt wird.

3. Ammoniak. — Die Ammoniakbestimmung habe ich leider versäumt, im frischen Harn auszuführen. Die nach etwa 2 Monaten an dem mit Chloroform konservierten Harn ausgeführte Bestimmung ergab einen für Pflanzenfresserharn so abnorm hohen Wert — 0,57 NH_3 im Liter —, daß ich daran zweifle, ob im frischen Harn ebensoviel Ammon enthalten gewesen ist. Jacksch¹⁾ hat kürzlich bemerkt, daß die hohen Werte für das Ammoniak, die Mörner bei der Phosphorvergiftung erhielt, wohl darauf zurückzuführen sind, daß der Harn, den er verwendete, durch die lange Aufbewahrung mit Chloroform doch zersetzt war. Ich muß mich diesen Zweifeln anschließen, wenn beweisende direkte Beobachtungen auch nicht vorliegen. Es ist sehr wohl möglich, daß ein harnstoffzersetzendes Enzym, wenn auch nur in Spuren, also sehr langsam wirkend, im Harn vorhanden ist.²⁾

4. Chlornatrium. — Die Chloride können nach Mohr titriert werden, obwohl die Hippursäure durch Silbernitrat gefällt wird. Es hat sich nämlich ergeben, daß das chromsaure Silber vor dem hippursäuren gefällt wird. Dieses bestätigen auch direkte Versuche an Harn mit und ohne Zusatz von hippursäurem Natron.

10 ccm menschlicher Harn wurde einerseits mit 90 ccm

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 146.

²⁾ In einem frischen Rinderharn (mehrere Tage unter Chloroformzusatz gesammelt) fand ich kürzlich auch 0,38 g NH_3 im Liter, sodaß es demnach doch scheint, daß der Rinderharn sich anders verhält wie Pferdeharn und Kaninchenharn.

Wasser, andererseits mit 80 ccm Wasser und 10 ccm einer völlig neutralen Lösung von Hippursäure, die 1% Hippursäure enthielt (also 0,1 g Hippursäure), versetzt, dann mit Silberlösung titriert, von der 1 ccm 0,01 NaCl entsprach.

Es wurde verbraucht:

a) bei genuinem Harn 7,2 resp. 7,15 ccm

b) nach Hippursäurezusatz 7,15 resp. 7,2

also absolut dieselben Mengen.

5. Phosphorsäure. — Für die Bestimmung der Phosphorsäure sind die gewöhnlich ausgeübten Methoden unanwendbar. Titrierung mit Uran ist bei den minimalen Mengen, um die es sich möglicherweise handelt, selbstverständlich ausgeschlossen, ebenso auch die gewichtsanalytische Bestimmung damit, denn was essigsäure Uranlösung aus dem Harn ausfällt, ist nicht phosphorsaures Uran.

Versetzt man 100 ccm Harn nach dem Ansäuern mit Essigsäure oder Zusatz von etwas sog. Essigsäuremischung mit essigsäurem Uran, so entsteht allmählich ein Niederschlag, welcher schon durch seine bräunliche Färbung von phosphorsaurem Uran abweicht. Um zu sehen, ob dieser Niederschlag überhaupt Phosphorsäure enthält, wurde er nach 24stündigem Stehen abfiltriert und bis zum Verschwinden der Chloridreaktion gewaschen. Filtrieren und Auswaschen ging sehr langsam. In dem Filtrat, das noch die ersten Portionen Waschwasser enthielt, bildete sich bei mehrtägigem Stehen aufs neue ein geringer Niederschlag von ähnlicher Beschaffenheit wie der erste. Beide Niederschläge wurden verascht, die Asche in Salpetersäure gelöst und die Lösung mit Ammoniummolybdat geprüft: es fand sich nur eine bedeutungslose Spur von Phosphorsäure. In anderen Fällen wurde der erste Niederschlag auf dem Filter mit verdünnter heißer Salzsäure behandelt unter wiederholtem Zurückgießen der Salzsäure auf das Filter: er löste sich nur zum kleinsten Teil auf. Die lichtbräunliche Lösung wurde mit Ammoniak neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und noch etwas Uranlösung zugesetzt. Die geringe Quantität des bräunlichen Niederschlages dann ebenso wie oben behandelt: auch so war Phosphorsäure nicht oder nur in bedeutungslosen Spuren nachweisbar.

Ebensowenig führte Zusatz von Magnesiamischung zum Ziel: in dem Niederschlag war keine Phosphorsäure nachweisbar. Endlich wurden noch 100 ccm mit Ammoniak stark alkalisiert und 24 Stunden stehen gelassen, in der Absicht, in dem etwa entstehenden Erdphosphatniederschlag Phosphorsäure nachzu-

weisen. Der nicht unbedeutliche allmählich sich bildende Niederschlag bestand aus Calciumcarbonat, vielleicht auch -hydroxyd, Magnesiumhydrat und Kieselsäure. Die Quantität der Kieselsäure war nicht unerheblich: sie betrug in einem Falle, in dem sie bestimmt wurde, 0,014 g, also 0,14 g im Liter. Dabei ist natürlich sicher nicht alle Kieselsäure ausgefallen.

Das eingeschlagene Verfahren war folgendes: Der gut gewaschene Niederschlag wurde mit Salzsäure behandelt, in der er sich unvollständig löste. Die filtrierte salzsaure Lösung wurde mit Ammoniak alkalisiert, mit Essigsäure angesäuert: es entstand ein äußerst gelatinöser, schwer filtrierbarer Niederschlag, welcher der Lage der Dinge nach nur Ferriphosphat, Aluminiumphosphat oder Kieselsäure sein konnte. Eisen und Phosphorsäure ließen sich nicht nachweisen. Nach der Löslichkeit des Niederschlages in schwacher Natronlauge und dem Verhalten zur Phosphorsalzperle (nach vorgängigem Glühen) bestand der Niederschlag zweifellos aus Kieselsäure. Die essigsäure Lösung enthielt Calcium und Magnesium, dagegen keine Phosphorsäure.

Allenfalls quantitativ bestimmbare Mengen von Phosphorsäure erhielt ich nach dem Veraschen von 50—100 ccm des Harns. Die direkte Veraschung oder nach dem Zusatz von Natriumcarbonat ist sehr umständlich, die Veraschung mit Salpetermischung kaum ohne Verluste ausführbar, wegen des hohen Gehalts an Hippursäure, die mit Salpetermischung stürmisch verbrennt. Die Veraschung mit Natriumsuperoxyd und Natriumcarbonat habe ich in diesem Falle nicht versucht, weil ich, wie ich bei dieser Gelegenheit bemerken will, mit dieser Methode bei wiederholten Versuchen mit Harn nur ungünstige Erfahrungen gemacht habe. Ich gedenke hierauf noch einmal zurückzukommen.

Dagegen hat mich das ältere Verfahren der Veraschung von A. Neumann¹⁾ mit Schwefelsäure und Ammoniumnitrat durchaus befriedigt. Es dauert zwar etwas lange, da man aber die Operation kaum zu beaufsichtigen braucht, ist dieses meistens kein Fehler. Ich habe mit einiger Geduld 50 ccm des sehr schwer verbrennenden Rinderharns mit 15 ccm Schwefelsäure zu einer wasserhellen Flüssigkeit auflösen können. Eine kleine Unbequemlichkeit liegt in dem Einschütten des Ammon-

¹⁾ Ach. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abteil., 1897, S. 552.

nitrats: das Salz zerfließt bei der Operation des Einschüttens und setzt sich am Spatel resp. den Rändern des Kjeldahlkolbens fest. Ich bin deshalb etwas anders verfahren: ich löste von Zeit zu Zeit einige Gramm Ammoniumnitrat, erhitzte die Lösung zum Sieden und ließ sie in den schräg stehenden Kjeldahlkolben einfließen. Das kann ohne alle Gefahr geschehen und die Verdünnung der Schwefelsäure bringt keinen Nachteil. Die schließlich erhaltene sirupdicke, ganz farblose Lösung wurde nach dem Erkalten mit Wasser verdünnt, nach einigem Stehen von der Kieselsäure abfiltriert, mit NH_3 alkaliert, dann mit Salpetersäure angesäuert und mit Ammonmolybdat unter Zusatz von Ammonnitrat gefällt. In Fällen, in denen die große Quantität Ammonsulfat in der Veraschungslösung keine Nachteile bringt, möchte ich das ältere Neumannsche Verfahren dem neueren¹⁾ mit Salpetersäure-Schwefelsäuremischung vorziehen, da es keine besondere Apparatur erfordert.

Ob die erhaltene Phosphorsäure aus Glycerinphosphorsäure stammt, oder die Gegenwart der organischen Substanzen des Harns die Fällung der Phosphorsäure verhindert und sie darum erst nach Zerstörung der organischen Substanz nachweisbar wird, oder ob beide Ursachen vorliegen, läßt sich vorläufig nicht entscheiden. Auch wenn der Harn mehr Phosphorsäure enthält, dürfte die Uranmethode nicht anwendbar sein, da die Uranlösung auch andere Körper des Rinderharns ausfällt. Leider bin ich erst nach Abschluß der Phosphorsäureversuche auf das Verfahren aufmerksam geworden, das Tangl²⁾ angewendet hat. Tangl hat den Harn — 500 ccm! — mit Salpetersäure gekocht und dann mit Ammonmolybdat ausgefällt. Übrigens fand Tangl im Pferdeharn in einigen Fällen auch nur sehr wenig Phosphorsäure (im Minimum nur 0,0008 im Liter), bei phosphorsäurereichem Futter aber nicht unbedeutliche Quantitäten (3,63 und 2,13 P_2O_5 pro Tag). Vorausgesetzt, daß die Glycerinphosphorsäure durch Kochen mit Salpetersäure mit Sicherheit zerstört wird, spricht der von Tangl gefundene minimale Gehalt dafür, daß die Ausfällung der Phosphorsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 115.

²⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, 1902, S. 368.

durch die organischen Substanzen nicht gestört wird, denn es ist nicht abzusehen, warum gerade in einzelnen Fällen die Glycerinphosphorsäure bis auf ein äußerstes Minimum vermindert sein sollte.

6. Schwefelsäure und Schwefel. — Direkt bestimmt wurden nach bekannter Methode der Gesamtschwefel, die Gesamtschwefelsäure, die gebundene Schwefelsäure; berechnet der neutrale Schwefel durch Abzug der Gesamtschwefelsäure vom Gesamtschwefel, die präformierte Schwefelsäure durch Subtraktion der Ätherschwefelsäure von der Gesamtschwefelsäure. Von den Verhältniszahlen ist auffallend die Inkonstanz von S:N, deren Ursachen sehr verschieden sein, z. B. im Futter oder im Tränkwasser liegen können, und die Übereinstimmung in dem Verhältnis Neutraler S:N. Ob dabei lediglich der Zufall gespielt hat, oder Gesetzmäßigkeiten in dieser Richtung vorliegen, müßten weitere Untersuchungen lehren.

7. Hippursäure. — Die Hippursäure ist diesmal nur durch Ausfällen des stark eingedampften Harns — 250 resp. 100 ccm — mit Salzsäure, Abfiltrieren nach 48 Stunden, Auswaschen mit möglichst wenig Wasser, Trocknen und Wägen bestimmt. Die angeführten Zahlen stellen also Minimalwerte dar. Von dem bei der Untersuchung des Pferdeharns angewendeten Verfahren der N-Bestimmung im Ätherauszug habe ich diesmal Abstand genommen, da mir Zweifel aufstiegen, ob im Pferde- oder Rinderharn der Gehalt des Harns an Skatolkarbonsäure und an Zersetzungsprodukten der Indoxylschwefelsäure nicht doch merkliche Fehler verursachen könnte.

Auf die Frage, ob der in den Ätherauszug übergehende Harnstoff — trotz des Ausschüttelns des Ätherauszuges mit Wasser nach Blumenthal¹⁾ — ein fehlerhaftes Plus bewirken könnte, möchte ich hier nicht eingehen, es scheint mir indessen, daß die Einwendungen von Soetbeer²⁾ gegen dieses Verfahren durch Blumenthal und Braunstein³⁾ im wesentlichen als nicht gerechtfertigt erwiesen sind.

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 40, Heft 3 u. 4.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 536.

³⁾ Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. III, S. 385.

Der Gehalt des Harns an Hippursäure ist sehr hoch: er entspricht 0,808^o/_o Benzoësäure. Harn II enthielt 1,0874^o/_o Hippursäure = 0,741^o/_o Benzoësäure.

Diese großen Quantitäten von Benzoësäure können natürlich nicht aus dem Eiweiß stammen. Harn I enthielt in 100 ccm 0,75 N entsprechend 4,688 g zersetztem Eiweiß. Wenn die Benzoësäure aus dem Eiweiß stammen sollte, so müßte dieses über 17^o/_o Benzoësäure geliefert haben, was natürlich unmöglich ist. Außerdem müßte man dann noch annehmen, daß alles Eiweiß im Darm durch Fäulnis zerfiel, oder daß das Eiweiß nicht allein bei der Fäulnis, sondern auch bei der Zersetzung in den Geweben Phenylpropionsäure liefere, alles Annahmen, deren äußerste Unwahrscheinlichkeit auf der Hand liegt. Die Hauptmenge der Hippursäure stammt augenscheinlich, wie man schon lange annimmt, aus im Futter enthaltenen, der Benzoësäure nahestehenden Körpern, namentlich der Chinasäure im Heu.

8. Phenol. — Sehr auffällig ist der geringe Gehalt des Harns an Phenol bzw. Kresol.¹⁾ Das gefundene Phenol braucht zur Bindung an Schwefelsäure 0,130 g (als SO₃ berechnet), während 0,779 g in Form von Ätherschwefelsäure vorhanden war. Es ist also nur etwa $\frac{1}{6}$ der gepaarten Schwefelsäure an Phenol gebunden, $\frac{5}{6}$ anderweitig. Dabei war der Gehalt an Indoxylschwefelsäure (siehe unten) relativ gering. Woran die übrigen $\frac{5}{6}$ der Schwefelsäure gebunden waren, bleibt unklar: die Gegenwart von Brenzcatechin oder Hydrochinon ist kaum anzunehmen, da der Harn sich beim Stehen durchaus nicht dunkler färbt, und auch im Ätherextrakt des mit Salzsäure erhitzten Harns nichts auf die Gegenwart dieser Körper in irgend erheblicher Menge hindeutete.

Während in diesem Falle also weit mehr Ätherschwefelsäure vorhanden war, als dem Kresol entspricht, kann nach

¹⁾ In Harn II war er noch geringer: Durch Bromwasserzusatz zum Destillat wurde überhaupt kein kristallinisches Tribromphenol, sondern nur ein schmierig bleibender Niederschlag erhalten, sodaß die Bestimmung auf diesem Wege unmöglich war. Eine vollständige Umwandlung des Niederschlages in kristallinisches Tribromphenol kommt wohl überhaupt nicht vor, es sind immer Schmierer beigemischt.

Einführung von Phenol auch der umgekehrte Fall eintreten. Als Beleg hierfür möchte ich einige Beobachtungen mitteilen, die vor langen Jahren gemacht sind, bald nachdem Baumann die Phenolschwefelsäure entdeckt hatte, zu einer Zeit, als die Behandlung von Wunden, Abszeßhöhlen etc. mit wässrigen Phenollösungen noch ganz allgemein üblich war. Ich habe die Versuche damals angestellt, um mich von der Richtigkeit der Angaben Baumanns, daß das Phenol vollständig als Ätherschwefelsäure im Harn erscheine, zu überzeugen. Das Ergebnis des Versuchs stand mit diesen Angaben für den Menschen nicht ganz in Einklang: von einer Veröffentlichung nahm ich damals aber Abstand, um nicht mit dem Arbeitsgebiet Baumanns zu kollidieren. Dann sind die Versuche in Vergessenheit geraten. Die Notizen über dieselben sind mir vor kurzem in die Hände geraten. So alt die Beobachtungen sind, so glaube ich doch, daß sie doch noch einiges Interesse haben.

Es handelte sich um 3 Harnen nach dem chirurgischen Gebrauch von Phenol (vermutlich von einem und demselben Kranken, da sie mir an 3 auf einander folgenden Tagen zgingen). Über die Tagesmenge finde ich nichts notiert.

Harn I. — 200 ccm lieferten 0,468 g BaSO_4 aus gepaarter Schwefelsäure und 1,944 g (!) Tribromphenol, es blieben somit noch 1,279 g Tribromphenol = 0,399 g Phenol in 200 ccm Harn in anderer Form, zweifellos an Glukuronsäure gebunden. Die Phenolglukuronsäuren und die gepaarten Glukuronsäuren überhaupt waren damals noch nicht bekannt. Ich möchte darauf aufmerksam machen, daß in diesem Falle die an Glukuronsäure gebundene Quantität Phenol fast doppelt so groß war, wie die an Schwefelsäure gebundene. Die Quantität der präformierten Schwefelsäure wäre in diesem Falle von besonderem Interesse gewesen, ich finde darüber aber nichts notiert.

Eine Quantität des Harns wurde eingedampft und mit Alkohol gefällt, mit Alkohol ausgewaschen. Die Fällung wurde in Wasser gelöst. Die Lösung war frei von präformierter Schwefelsäure. Eine nicht bestimmte Quantität der Lösung wurde mit Salzsäure angesäuert und destilliert, im Destillat das Phenol, in der rückständigen Flüssigkeit im Kolben die ent-

standene Schwefelsäure bestimmt. Es wurde erhalten: BaSO_4 aus abgespaltener Schwefelsäure 0,097 g, Tribromphenol 2,006 g. Die abgespaltene Schwefelsäure entspricht 0,138 g Tribromphenol, also war das 1,868 g Tribromphenol entsprechende Phenol in anderer Form, d. h., wie wir jetzt sagen können, als Phenolglukuronsäure vorhanden. Demnach waren in der Lösung nur $\frac{1}{15}$ des Phenols als Phenolschwefelsäure, $\frac{11}{15}$ als Phenolglukuronsäure vorhanden, während in dem genuinen Harn die Verteilung etwa $\frac{1}{3}$ zu $\frac{2}{3}$ war; somit ist das phenolschwefelsaure Salz weit leichter in Alkohol löslich, wie das phenolglukuronsaure. Die Beobachtung läßt sich vielleicht für die Darstellung der Phenolglukuronsäure verwerten.

Harn II. — Aus 100 cem wurden nach dem Ansäuern mit Essigsäure, Zusatz von BaCl_2 , Abfiltrieren und nachträglichem Auswaschen mit Salzsäure (ursprüngliches Baumannesches Verfahren) erhalten 0,503 g BaSO_4 , aus 100 cem mit Salzsäure erhitzten Harns 0,695 g, aus abgespaltener Schwefelsäure stammten also 0,192 g BaSO_4 . 100 cem Harn lieferten andererseits 0,2475 g Tribromphenol. Da 0,192 g BaSO_4 0,272 g Tribromphenol entsprechen, so wäre in diesem Falle nur wenig Phenolglukuronsäure neben Sulfatschwefelsäure vorhanden.

Harn III. — 100 cem gaben 0,491 g BaSO_4 aus präformierter Schwefelsäure, 0,8145 g aus Gesamtschwefelsäure, also 0,3235 g BaSO_4 aus gebundener Schwefelsäure. 100 cem lieferten 0,804 g Tribromphenol. Die gebundene Schwefelsäure entspricht 0,460 g Tribromphenol, somit stammte das 0,344 g Tribromphenol entsprechende Phenol aus Phenolglukuronsäure. Diese Beobachtung zeigt, daß im Harn eine beträchtliche Menge Phenolglukuronsäure neben einer ansehnlichen Menge präformierter Schwefelsäure vorhanden sein kann, daß also die Glukuronsäurebindung keineswegs immer erst aushilfsweise eintritt, wenn es im Organismus an Schwefelsäure mangelt, wie Baumann und Herter¹⁾ bei ihren Versuchen an Hunden fanden; l. c. S. 247 heißt es:

Bei genügender Menge des eingeführten Phenols verschwinden die schwefelsauren Salze aus dem Harn vollkommen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 244

alsdann tritt ein Teil des Phenols auch noch in einer anderen nicht näher gekannten Verbindung in den Harn über.

Diese Anschauung ist wohl auch die allgemein übliche. So sagt Huppert in seinem großen Handbuche der Harnanalyse, 10. Aufl., S. 146: «Dem Körper direkt zugeführte Phenole erscheinen im Harn als Ätherschwefelsäure und verursachen eine Vermehrung dieser auf Kosten der Sulfatschwefelsäure. Reicht die verfügbare Menge der Schwefelsäure nicht aus, so liefert der Überschub Phenolglukuronsäure.

An der Richtigkeit der Beobachtungen von Baumann und Herter ist ja natürlich nicht zu zweifeln, aber ihre Versuche sind an Hunden gemacht und die Verallgemeinerung augenscheinlich nicht zulässig.

Gegen die Anschauung, daß die Glukuronsäure immer erst an die Reihe kommt, wenn die Schwefelsäure nicht ausreicht, spricht auch der von C. Neuberg und P. Mayer¹⁾ geführte Nachweis des Vorkommens der Phenolglukuronsäure und Indoxylglukuronsäure im normalen menschlichen Harn, der dabei doch stets auch reichlich Sulfatschwefelsäure enthält. Allerdings kommen diese gepaarten Glukuronsäuren nur in Spuren vor und spurenweise können im Organismus sehr wohl Reaktionen verlaufen, ohne daß sie für eingeführte oder gebildete größere Mengen von Substanzen in Betracht kommen. Es wäre also sehr wohl möglich, daß sich normalerweise Spuren von gepaarten Glukuronsäuren bilden und doch eingeführtes Phenol ausschließlich als Ätherschwefelsäure ausgeschieden würde. Gegen die sekundäre Rolle der Glukuronsäuren sprechen aber auch Beobachtungen von P. Mayer,²⁾ nach welchen unter gewissen Verhältnissen, in denen die Quantität der Glukuronsäuren im Organismus steigt, z. B. bei gehinderter Oxydation durch künstliche Beschränkung der Atmung, die gepaarten Glukuronsäuren zunehmen, die Ätherschwefelsäuren abnehmen, also ein Alternieren beider Verbindungen stattfindet. Ganz beweisend für die Anschauung, daß Ätherschwefelsäurebildung und Bildung gepaarter Glukuronsäuren neben einander verlaufen, sind end-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 256.

²⁾ Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 16 u. 17.

lich die Beobachtungen, welche E. Wang¹⁾ bei Fütterung mit Indol an Hunden gemacht hat. Schon nach Einführung verhältnismäßig kleiner Mengen Indol — 0,25—0,50 g — wurden 21,3—26,5% des Indoxyls nicht als Indoxylschwefelsäure, sondern als Indoxylglukuronsäure ausgeschieden, während der Harn noch reichlich Schwefelsäure enthielt, das Doppelte bis Dreifache der Ätherschwefelsäure. Auch diese Beobachtung zeigt aufs deutlichste, daß die Bildung gepaarter Glukuronsäure und Ätherschwefelsäure neben einander verlaufen und nicht erst Glukuronsäurebildung eintritt, wenn der Vorrat an verfügbarer Schwefelsäure erschöpft ist.

Das Verhältnis von Phenol : N ist beim Rind wesentlich weiter, als beim Pferd. Das deutet darauf hin, daß der bakteritische Eiweißzerfall beim Pferd größer ist, als beim Rind. Wie groß er ist, ein wie großer Teil des verzehrten Eiweißes der Wirkung der Bakterien im Darm verfällt, das ist eine Frage, die ein großes allgemeines biologisches Interesse hat, vorläufig aber kaum exakt beantwortet werden kann. Es liegt sehr nahe, als Maßstab der Eiweißzersetzung im Darm die Phenolausscheidung durch den Harn zu benutzen. Dabei ist natürlich Voraussetzung, daß mit dem Futter nicht außer dem Eiweiß Substanzen eingeführt werden, aus denen sich Phenol oder Oxysäuren bilden können. Diese Voraussetzung dürfte bei speziell darauf gerichteten Versuchen wohl nicht zu schwer erfüllbar sein, aber auch wenn sie erfüllt ist, machen sich doch verschiedene Schwierigkeiten hinsichtlich der Berechnung geltend.

In Faulflüssigkeiten finden wir als Repräsentanten der Oxyphenylgruppe nicht nur flüchtige Phenole, sondern auch aromatische Oxysäuren. Das relative Verhältnis zwischen diesen beiden ist sehr wechselnd, zum Teil sicher abhängig von der Dauer der Fäulnis: je länger sie dauert resp. je intensiver sie ist, desto größer ist der Anteil des flüchtigen Phenols, desto geringer die Quantität der Oxysäuren. Sowohl die flüchtigen Phenole als auch die Oxysäuren werden fast vollständig resorbiert. Wenn man voraussetzen könnte, daß sie vollständig im Harn erscheinen, als solche oder in charakteristischer Form, so würde

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 557.

die Berechnung des zersetzten Eiweißes keine Schwierigkeit machen, da wir für die Bestimmung der flüchtigen Phenole genaue Methoden besitzen, für die Bestimmung der Oxysäuren wenigstens einigermaßen brauchbare. Vollständige Ausscheidung ist nun aber nur für die Oxysäuren wahrscheinlich, für die flüchtigen Phenole gilt das nicht.

Bei der Fäulnis außerhalb des Körpers entsteht bekanntlich bald mehr Phenol, bald mehr Kresol, die Verhältnisse sind wechselnd und in ihren Ursachen nicht durchsichtig. Mitunter bekommt man reines Phenol vom richtigen Siedepunkt.¹⁾ Da der Harn der Pferde und Rinder hauptsächlich Kresolverbindungen enthält (Baumann und Brieger), so muß man annehmen, daß bei der Fäulnis des Eiweißes in ihrem Darmkanal hauptsächlich p-Kresol entsteht. Es fragt sich, wie sich dasselbe nach der Resorption verhält. E. Baumann²⁾ fand an Hunden, daß eingegebenes p-Kresol zum Teil zu p-Oxybenzoesäure oxydiert wird, nach Verfütterung von 12 g p-Kresol erhielt er 1 g p-Oxybenzoesäure; Preusse,³⁾ der den Versuch wiederholte, nach 15 g 1,5 g Oxybenzoesäure: ein Teil wird also jedenfalls oxydiert. Direkte Versuche darüber, wieviel von eingegebenem Kresol man durch Destillation des Harns wiedererhält, sind meines Wissens nie angestellt, dagegen ist es bekannt, daß man von Phenol durchaus nicht die ganze Quantität wiedererhält, sondern nur einen nach der Quantität des eingegebenen Phenols wechselnden Bruchteil. An einem Pferd, das hier in erster Linie interessiert, stellte J. Munk⁴⁾ folgendes fest: das Pferd schied bei einer bestimmten Ernährung 5—6 g Phenol resp. Kresol als Phenol berechnet pro Tag aus. Als es nun 20 g Phenol in den Magen erhielt, steigerte sich die Ausscheidung an den beiden folgenden Tagen auf 10—11 g, durchschnittlich wurde also nur die Hälfte des Phenols wieder ausgeschieden. Wenn nun auf einmal eingeführtes Phenol in so großem Umfang der Oxydation unterliegt, so wird das für das im Körper entstehende

¹⁾ Ich gedenke hierauf noch einmal zurückzukommen.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 251.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 57.

⁴⁾ Malys Jahresber. f. Thierchemie, J. 1881, Bd. XI, S. 223.

und allmählich resorbierte erst recht gelten. Daß das p-Kresol sich ebenso oder ähnlich verhält, ist mindestens sehr wahrscheinlich. Demnach müßte man also die Quantität des im Harn gefundenen Kresols verdoppeln, um das im Darmkanal entstehende Kresol zu finden.

Nun fragt sich noch, ob man nicht auch die aromatischen Oxysäuren des Harns berücksichtigen müsse, da unter Umständen die Oxyphenylgruppe zu einem wesentlichen Teil in dieser Form erscheinen könnte. Der Berücksichtigung der Oxysäuren bei der Berechnung des Umfanges des bakteritischen Eiweißzerfalles stehen aber verschiedene Bedenken entgegen. Zunächst ist ein prinzipieller Einwand zu erheben. Durch die Untersuchungen von Thierfelder und Nuttall¹⁾ ist mit Bestimmtheit der Nachweis erbracht, daß auch bei absolut aseptischer Ernährung, bei vollständiger Abwesenheit von Bakterien im Darmkanal, im Harn aromatische Oxysäuren vorhanden sind, während Phenol, Kresol, Indoxyl etc. fehlen. Es müssen also, wie Thierfelder und Nuttall hervorheben, Oxysäuren auch in den Geweben entstehen und wir sind nicht berechtigt, sie ausschließlich auf Eiweißzerfall im Darmkanal zu beziehen.

Außerdem ist nach den oben erwähnten Befunden von Baumann und Preusse mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auch ein Teil des im Organismus entstehenden Kresols zu p-Oxybenzoesäure oxydiert wird. Wenn wir die Oxysäure im Harn summarisch bestimmen, treffen wir die p-Oxybenzoesäure mit, wir würden also, vorausgesetzt, daß wir das entstandene Kresol durch Multiplikation des im Harn gefundenen mit 2 berechnen, einen Fehler begehen, indem wir einen Teil des Kresols fälschlich doppelt rechnen. Es wird also am besten sein, die Oxysäuren überhaupt nicht zu berücksichtigen. Das hat keine großen Bedenken, da der Gehalt des Harns an Oxysäure wenigstens im Rinderharn ziemlich gering ist, für den Pferdeharn fehlt es mir an Erfahrungen.

Berechnet man nun den bakteritischen Eiweißzerfall beim Pferd aus dem Kresol, so gelangt man zu auffallend hohen Werten. Setzt man den Tyrosingehalt des Nahrungseiweißes zu

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 62.

3.5⁰/₀, was sicher nicht zu niedrig ist, so würden 100 g-Eiweiß im besten Fall, d. h. wenn die Oxysäuren vollständig zersetzt werden, 1,818 g Phenol liefern, bezw. Kresol als Phenol berechnet. In dem der Tabelle zugrunde liegenden Falle schied das Pferd in 24 Stunden 65,34 g N aus und 2,349 g Phenol¹⁾ (resp. 2,813 g Kresol). Diese erfordern zu ihrer Entstehung ca. 129 g Eiweiß. Nach Ausweis der N-Bestimmung sind im Körper des Tieres in 24 Stunden 408,4 g Eiweiß zerfallen.²⁾ Davon würde fast $\frac{1}{3}$ im Darmkanal durch Bakterien in Spaltungsprodukte gespalten sein, welche für den Organismus wertlos sind. Denn es ist einleuchtend, daß so tiefgehende Spaltungsprodukte, wie sie die bakteritische Zersetzung liefert, für die Ernährung der Zellen nicht in Betracht kommen, daß sie jedenfalls nicht als Eiweiß funktionieren können, sondern im besten Falle ihrem kalorischen Wert nach. Dabei ist noch gar nicht einmal in Betracht gezogen, daß das entstandene Kresol doch sicher einer partiellen Oxydation unterliegt. Nimmt man eine Zerstörung von 50⁰/₀ an, wie für das eingeführte Phenol, so gelangt man gar zu 258 g aus dem zerstörten Eiweiß, also fast $\frac{2}{3}$ des verwerteten Nahrungseiweißes! Der Organismus des Pferdes würde also mit einer gradezu ungeheuerlichen Verschwendung von Eiweiß arbeiten.

Danach kann es wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß das Kresol nicht vollständig aus der Eiweißfäulnis stammt, sondern daß das Futter des Pferdes, das in diesem Falle aus 2 Kilo Hafer, 2 Kilo Heu, 1 Kilo Weizenkleie und einer nicht genau bestimmten Quantität Häckselstroh pro Tag bestand, eine nicht unerhebliche Quantität Kresol oder Phenol in einer leicht abspaltbaren Form präformiert enthalten haben muß. Oder man müßte annehmen, daß der Eiweißzerfall im Organismus des Pferdes ganz anders erfolgt, als in dem des Menschen, daß beim Pferd die Phenolgruppe des Eiweißes, die beim Menschen fast vollständig oxydiert wird, verschwindet, beim Pferd größtenteils als solche ausgeschieden wird — eine Annahme, zu der

¹⁾ Die in Bd. IX dieser Zeitschrift, S. 244 angeführte Zahl 2.445 beruht auf einem Rechenfehler.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 241.

man sich wohl sehr schwer entschließen wird: die Entscheidung hierüber wäre wohl auf dem Wege des Versuchs herbeizuführen. Der Unterschied zwischen dem Rind und Pferd bezüglich der Phenolausscheidung bleibt auf alle Fälle bestehen und es ist sehr unwahrscheinlich, daß er auf einer Verschiedenheit des Futters beruht, denn gerade das Futtermittel, das von den genannten am meisten als Quelle des Phenols in Betracht kommt, das Heu, war in dem Futter des Rindes in relativ weit größerer Menge vorhanden, als in dem Futter des Pferdes. Über alle diese Fragen würden nur systematische Untersuchungen Aufschluß geben können.

9. Indoxyl. — Die Bestimmung des Indoxyls resp. Indigoblaus geschah nach dem zum Teil auf älteren Angaben von E. Baumann und Obermayer beruhenden vielfach modifizierten Verfahren von Wang.¹⁾ Bezüglich der Ausführung des Verfahrens bemerke ich folgendes:

Zur vorgängigen Fällung habe ich nicht Bleiacetat, sondern nach dem Vorgange von Bouma und Ellinger Bleisubacetat — in der Regel $\frac{1}{10}$ Vol. — benutzt. Meistens wurden 100 ccm Harn, 100 ccm Wasser, 20 ccm Bleisubacetat angewendet, mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt, vom Filtrat je 100 ccm = $33\frac{1}{3}$ ccm Harn zu 2 Bestimmungen benützt. Warum ich in der Regel so stark verdünnte, wird aus den späteren Ausführungen hervorgehen. Die Mischung von Harnfiltrat und eisenchloridhaltiger Salzsäure (gleiche Volumina) wurde nach etwa 5—10 Minuten langem Stehen mit Chloroform geschüttelt. Die Ausschüttelung ging sehr leicht vonstatten: wiederholt wurde die ausgeschüttelte Mischung nach längerem oder kürzerem Stehen aufs neue mit Chloroform geschüttelt, jedoch niemals eine erneute Blaufärbung des Chloroforms beobachtet. Wurde jedoch die Mischung schon nach 1—2 Minuten oder sofort geschüttelt, so nahmen die 2. und 3. Portion noch wesentliche Mengen Indigoblau²⁾ auf, augenscheinlich weil die Spaltung und Oxydation in so kurzer Zeit noch nicht zu Ende war.

¹⁾ Bezüglich der Literatur vergl. Ellinger, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

²⁾ Auf die Streitfrage, ob der Auszug Indigoblau enthält oder, wie Maillard meint, einen diesem nahestehenden Körper, brauche ich hier wohl nicht einzugehen.

Es schien mir notwendig, die Indigochloroformlösung zu filtrieren, um sicher zu sein, daß nicht eisenhaltige Salzsäure in den Destillationskolben gelangte. Dabei zieht sich unvermeidlich etwas Indigolösung in den Rand des Filters ein, sodaß derselbe blau erscheint. Um keinen Verlust an Indigoblau zu erleiden, erschien es zweckmäßig, zum Schluß die Ränder des Filters nach innen umzuschlagen und direkt Chloroform aufzugießen. Dabei geht das noch anhaftende Indigoblau in Lösung. Stets bemerkte ich auf dem Filter in den unteren Partien einen leichten Rosahauch, der auch durch längeres Waschen mit Chloroform nicht zu beseitigen war. Der nach dem Abdestillieren des Chloroformauszuges bleibende Rückstand wurde gereinigt (siehe weiter unten), dann mit 10 ccm Schwefelsäure 10 Minuten lang auf dem stark kochenden Wasserbad erhitzt. Die schwefelsaure Lösung erschien rein blau,¹⁾ ebenso auch die wässrige Lösung der Indigoblauschwefelsäure. Zur Titrierung diente der Einfachheit halber die bei Wasseruntersuchungen übliche $\frac{1}{100}$ N.-Kaliumpermanganatlösung, auf das Vierfache verdünnt. 1 ccm derselben entspricht nach der Wangschen Angabe 0,165 mg Indigo. Nach Ellinger ist es zwar notwendig, die Kaliumpermanganatlösung auf reines Indigoblau zu stellen, da es sich hier aber doch nur um Annäherungswerte handelte, glaubte ich mich auf die angegebene, nicht direkt gestellte Lösung beschränken zu können, umsomehr als ich nebenher auch zu einem bestimmten Zweck die $\frac{1}{100}$ N.-Lösung selbst brauchte (siehe hierüber weiter unten). Die Endreaktion beim Titrieren war stets scharf, die Lösung nach Beendigung der Titration fast farblos, nur schwach gelb.²⁾ Beides gilt aber nur, wenn der Chloroformverdampfungsrückstand vorher gut «gereinigt» war.

Bezüglich dieser «Reinigung» weichen die einzelnen Autoren

¹⁾ Bekanntlich löst sich Indigoblau in Schwefelsäure zunächst mit gelber Farbe, welche erst allmählich durch Grün in Blau übergeht. In neuerer Zeit bin ich jedoch auf einen Rinderharn gestoßen, dessen Chloroformrückstand auch nach sorgfältiger Reinigung keine reine blaue Lösung gab.

²⁾ Auch bei diesem Punkt habe ich zu bemerken, daß ich in neuerer Zeit auf einen Rinderharn gestoßen bin, für den diese Angaben nicht vollständig zuträfen.

bekanntlich von einander ab. Ellinger reinigt den Rückstand durch 2—3 malige Behandlung mit heißem Wasser, Wang durch Behandlung mit einem Gemisch gleicher Teile Alkohol, Äther und Wasser, Obermayer durch 45%igen Alkohol, Bouma gar nicht, weil seiner Ansicht nach dabei Indigoderivate verloren gehen können. Daß eine Reinigung bei Rinderharn durchaus erforderlich ist, sollte man nach dem bloßen Augenschein ohne weiteres annehmen. Der beim Verdunsten des Chloroformauszuges bleibende Rückstand bildet eine braune schmierige Masse, welche nach allem anderen eher aussieht, als nach Indigo und stark nach p-Kresol riecht, das also unter den beim Versuch herrschenden Bedingungen schon in der Kälte abgespalten wird. Die Lösung des ungereinigten Rückstandes in konzentrierter Schwefelsäure ist olivgrün. Die verdünnte Lösung schmutzig-grünlich-blau und etwas trüb, eine scharfe Erkennung des Endpunktes der Titration war mir nicht möglich. Soweit aber ein Urteil möglich war, schien trotzdem die Endreaktion durchaus nicht entsprechend der Verunreinigung hinausgeschoben. Diese Erscheinung war mir sehr auffallend, bis sie durch weitere Beobachtungen aufgeklärt wurde.

Bezüglich der Reinigung nach Ellinger machte ich folgende Beobachtungen:

Behandelt man den Rückstand 3 mal mit je etwa 10 ccm heißem Wasser unter gelindem Umschwenken, so zeigen die ersten 10 ccm dichte Trübung mit Bromwasser und intensive Millonsche Reaktion, die zweiten 10 ccm beides schon sehr viel schwächer, die dritten keine Trübung mit Bromwasser und keine merkliche Millonsche Reaktion. Kresol und Oxysäuren sind also vollständig entfernt, vermutlich auch der größte Teil der Hippursäure, soweit sie nicht schon durch Bleisubacetat gefällt war, aber nicht sämtliche Verunreinigungen. Dies zeigt sich namentlich daran, daß die Innenwand des Kolbens vom Wasser nicht benetzt wird. Das Chloroform extrahiert aus dem Harn vermutlich Fettsäuren.¹⁾ Ein großer Vorzug dieses Verfahrens

¹⁾ Ich brauche wohl kaum zu bemerken, daß der Scheidetrichter absolut frei von Fett war; solches oder irgend ein anderes Schmiermittel wende ich überhaupt nie an; neu eingekaufte Schütteltrichter werden,

ist, daß sich bei vorsichtigem Arbeiten kein Indigoblau vom Kolben ablöst. Die Ausführung der Bestimmung wird dadurch wesentlich erleichtert.

Die Reinigung nach Wang mit der Äther-Alkohol-Wassermischung ist anscheinend vollständiger, der Kolben wird nach der Reinigung von Wasser benetzt, es ging aber stets etwas Indigorot in Lösung, bald mehr, bald weniger oder korrekter gesagt: die Lösung war etwas rötlich. Fast ausnahmslos löste sich das Indigoblau zum großen Teil vom Kolben ab. Dies ist ein sehr unangenehmes Vorkommnis. Man soll dann nach Wang filtrieren, das Indigoblau waschen, das Filter trocknen, zur Lösung des Indigoblau mit Chloroform behandeln, die Lösung aufs neue destillieren usw., das ist zweifellos eine sehr umständliche Prozedur. Aber nicht allein das, viel unangenehmer ist, daß es kaum möglich ist, das Indigoblau, nachdem das Filter einmal getrocknet ist, wieder in Lösung zu bringen. Ganz vollständig ist mir dieses überhaupt nicht gelungen, selbst dann nicht, wenn das Filter zerschnitten und im Kolben mit Chloroform ausgekocht wurde. Ausdrücklich betone ich indessen, daß alle meine Bemerkungen sich nur auf Rinderharn beziehen, für andere Harn liegen offenbar die Verhältnisse wegen der geringeren Quantität von Phenol etc. günstiger. Man kann aber, wie ich später bemerkte, das Filtrieren durch einen Kunstgriff ganz umgehen. Wenn man nämlich die abgossene Wangsche Lösung mitsamt dem darin suspendierten Indigo auf dem Wasserbad erwärmt, zuerst schwach, so lange Äther entweicht, dann stärker und dabei einengt, so scheidet sich das Indigoblau sehr rein mit dem charakteristischen kupferroten Reflex als Häutchen ab und man kann nun mit einiger Geschicklichkeit die Lösung so abgießen, daß das Häutchen an der Schale haften bleibt, ganz ohne Verlust oder mit einem unendlich geringen. Natürlich darf man dabei nicht darauf bestehen, die Flüssigkeit durch den Ausguß abzugießen, vielmehr muß man öfters über den Rand der Schale hinweggießen. Man

wenn sie eingefettet sind, sorgfältig vom Fett befreit. Ich erwähne dieses mit Rücksicht auf die Bemerkung von Ellinger, Bd. XXXVIII dieser Zeitschrift, S. 192, Fußnote.

kann auch die Flüssigkeit mit der Pipette absaugen.¹⁾ Die Schale wird dann auf dem Wasserbad getrocknet, der Inhalt mit Schwefelsäure behandelt und die Lösung in den Kolben gegossen.

Dampft man die abgegossene Wangsche Flüssigkeit weiter ein und überläßt den Rest der freiwilligen Verdunstung, so bleiben Kresol und Indigorot(?) zurück, auch kristallisiert etwas Hippursäure aus. Dieselbe wird also durch den Bleiessig nicht vollständig gefällt, auch die Vermehrung der Quantität des Bleiessigs änderte hieran nichts.

Die Reinigung nach Obermayer hatte gleichfalls den Effekt, daß sich das Indigoblau fast ganz ablöste. Außerdem ging Indigorot in Lösung, die fettartige Substanz wurde nicht entfernt, die Innenwand des Kolbens wurde vielmehr ebenso wenig vom Wasser benetzt, wie nach der Ellingerschen Reinigung.

Für die weitere Untersuchung habe ich mich auf das Verfahren von Ellinger und Wang beschränkt; ich gebe dem Ellingerschen Verfahren, wenigstens für Rinderharn — denn über andere habe ich keine Erfahrung — den Vorzug, weil es weit bequemer ist, keinen Verlust an Indigorot herbeiführt und man durch Bromwasser und Millonsches Reagens prüfen kann, ob die Reinigung vollständig erreicht ist. Dazu kommt noch, daß bei dem Wangschen Verfahren die im Kolben hängenbleibenden Reste der Äther-Alkohölmischung Fehler verursachen können (siehe hierüber weiter unter). Ist nun die Reinigung nach dem einen oder anderen Verfahren genügend? Ist man sicher, daß die bis zur Entfärbung verbrauchte Quantität Kaliumpermanganat in der Tat nur auf Indigo zu beziehen ist?

Diese Frage würde ohne weiteres zu bejahen sein, wenn man nachweisen könnte, daß diejenigen Substanzen, von welchen allenfalls noch Reste in dem gereinigten Rückstand vorhanden sein könnten, die Endreaktion, d. h. die Entfärbung von Indigolösung durch Kaliumpermanganat überhaupt nicht hinausschieben.

¹⁾ Indessen gelingt diese mechanische Abscheidung des Indigoblau nicht ausnahmslos.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden Versuche mit einer Lösung von indigschwefelsaurem Natron (Kahlbaum) angestellt, welcher 1%ige Lösungen von Hippursäure, Phenol, Kresol, p-Hydrocumarsäure — als Vertreter der Oxysäuren — hinzugesetzt wurden.

Die Lösung des indigschwefelsauren Natrons war so verdünnt, daß 10 ccm derselben 10,2 ccm der schwachen Kaliumpermanganatlösung bis zur Entfärbung brauchten = 1,683 mg Indigoblau. Es wurden regelmäßig 10 ccm Indigolösung, ca. 90 ccm Wasser und 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure angewendet, direkt titriert, ohne die Wiederabkühlung der Flüssigkeit abzuwarten. Es ergab sich, daß der Zusatz von Hippursäure — unter Zusatz von Na_2CO_3 bis zur genau neutralen Reaktion gelöst — in Quantitäten von 2 Tropfen, 0,2 ccm und 1 ccm keinen merklichen Einfluß auf den Eintritt der Endreaktion hat. Der Einfluß der andern erwähnten Körper geht aus der folgenden Tabelle hervor, welche die Anzahl der Kubikzentimeter Kaliumpermanganatlösung angibt, die für 10 ccm Indigolösung + Zusätzen bis zur Entfärbung erforderlich waren.

Zusatz	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Fehlerhaftes Plus in ccm Kaliumpermanganat
1 ccm Phenollösung	20,45	10,3
0,2 „ „	17,45	7,25
2 Tropfen „	14,35	4,15
1 ccm Kresollösung	47,75	37,55
0,2 „ „	22,0	11,8
2 Tropfen „	13,3	3,1
1 ccm p-Hydrocumarsäurelösung	36	25,8
0,2 „ „	17,2	7,0
2 Tropfen „	12,75	2,55

wart leicht oxydabler Substanzen verläuft also in der Art, daß vorwiegend das Indigoblau oxydiert wird, in geringem Grade aber auch die anderweitigen Substanzen, sodaß deren Gegenwart einen immerhin recht erheblichen Fehler verursacht.

Hiermit war nun die Beobachtung nicht recht in Einklang zu bringen, daß die Titrierung des ungereinigten Rückstandes zwar etwas mehr Kaliumpermanganatverbrauch ergab — soweit man das überhaupt beurteilen kann; die Endreaktion ist in ungereinigten Indigolösungen, wie gesagt, unsicher —, aber doch nicht entfernt soviel mehr, als man nach der Schätzung des Gehaltes an Kresol etc. annehmen sollte.

Um hierüber ins klare zu kommen, untersuchte ich die Ellingerschen Spüllösungen selbst und zwar einerseits für sich, andererseits unter Zusatz von Indigokarminlösung. Bei der direkten Oxydation der von einer Indigobestimmung vereinigten Spüllösungen mit Kaliumpermanganat wurde selbst bei Zusatz von 15 ccm der starken Lösung bleibende Rotfärbung regelmäßig nicht erreicht.

Es wurden nun andererseits zu den Spüllösungen 10 ccm Indigokarminlösung und 10 ccm konzentrierte H_2SO_4 hinzugesetzt und auf Entfärbung titriert. Statt 10,2 ccm wurden bei verschiedenen Rinderharnen 22,9 — 26 — 33,8 ccm gebraucht, also 12,7 — 15,8 — 22,6 ccm mehr.

Der starke Mehrverbrauch von Kaliumpermanganat bei Gegenwart der untersuchten aromatischen Substanzen bis zur Entfärbung stimmt nun anscheinend mit dem oben über die Titrierung ungereinigter Rückstände Mitgeteilten nicht überein. Bei näherer Überlegung mußte ich mir aber sagen, daß die Bedingungen nicht die gleichen seien. Es war anzunehmen, daß sich beim Erhitzen des Chloroformlösungsrückstandes mit H_2SO_4 Sulfosäuren bilden, und es war wohl denkbar, daß diese schwer oxydierbar sind und deshalb von geringerem Einfluß auf die Endreaktion, d. h. auf die Entfärbung von Indigolösung sind.

Das ergab sich nun in der Tat.

1 g p-Kresol wurde mit 10 ccm H_2SO_4 etwa 25 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt, dann abgekühlt, mit Wasser ver-

dünnt und auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung enthielt also, wie die früher angewendeten, 1% p-Kresol, jedoch in Form von Sulfosäure. Es wurden nun zu 10 ccm derselben Indigoschwefelsäurelösung wechselnde Mengen der Kresolsulfonsäurelösung gesetzt, dann wie gewöhnlich titriert.

Zusatz	Kaliumpermanganatlösung verbraucht in ccm	Fehlerhaftes Plus in ccm
1 ccm	14,0	3,8
0,2 ccm	11,4	1,2
2 Tropfen	10,7	0,5

Vergleicht man damit die für freies Kresol erhaltenen Zahlen, so sieht man, daß der Unterschied enorm ist. Die Sulfosäuren haben also nur geringen Einfluß auf das Eintreten der Endreaktion.

Mit Rücksicht darauf, daß bei der Indigobestimmung der Chloroformverdunstungsrückstand nur 10 Minuten mit H_2SO_4 erhitzt wird, war es von Interesse, zu sehen, ob diese Zeit schon ausreicht zur Bildung der Sulfosäure. Der Versuch wurde also ganz ebenso wiederholt, jedoch nur 10 Minuten mit H_2SO_4 erhitzt. Das Resultat war fast ganz dasselbe.

Zusatz	Kaliumpermanganatlösung verbraucht in ccm	Fehlerhaftes Plus in ccm
2 ccm	14,2	4,0
0,2 ccm	11,35	1,15
2 Tropfen	10,8	0,6

Ja, sogar als 1 g p-Kresol nur 1—2 Minuten mit H_2SO_4 auf dem stark siedenden Wasserbade erhitzt, im übrigen ebenso verfahren wurde, betrug das fehlerhafte Plus für 2 ccm nur 4,5—5 ccm der dünnen Permanganatlösung. Ich glaubte mich hierbei auf das Kresol beschränken und Versuche mit Phenol und Oxysäure unterlassen zu können. Es war nun noch die Probe auf das Exempel zu machen, d. h. festzustellen, daß die bei der Ellingerschen Reinigung in das Wasser übergehenden Phenolsubstanzen als Sulfosäuren keinen wesentlichen Einfluß auf die Endreaktion der Indigotitrierung ausüben. Zu dem Zweck wurden diese Reinigungsflüssigkeiten mit Äther ausgeschüttelt, der Äther bei gelinder Wärme verdunstet, der Rückstand ca. 10 Minuten mit 10 ccm H_2SO_4 erhitzt, verdünnt, 10 ccm Indigokarminlösung und die entsprechende Quantität Wasser hinzugesetzt, titriert. Es wurden verbraucht 15,4 resp. 14,9 ccm, also ein fehlerhaftes Plus von 5,2 ccm und 4,7 ccm. Derselbe Versuch wurde noch mit dem Verdunstungsrückstand der Wangschen Spülflüssigkeit gemacht, nach dem Erhitzen mit Schwefelsäure. Die schwefelsaure Lösung war jedoch so stark braun resp. nach dem Verdünnen mit Wasser gelb gefärbt, daß eine Erkennung der Endreaktion nicht möglich war. Damit ist es aufgeklärt, wie es kommt, daß die Titrierung des ungereinigten Rückstandes nicht gänzlich widersinnige Resultate gibt. Selbstverständlich wird die direkte Titrierung bei andern Harnen noch weit eher möglich sein, als bei Rinderharn, der wegen seines höheren Gehaltes an Kresol etc. besonders ungünstige Bedingungen bietet.

Es werden also beim Rinderharn durch die Reinigung sehr erhebliche Mengen von oxydablen Substanzen entfernt, welche den Endpunkt der Reaktion beim Titrieren des Indigos auf Farblosigkeit notwendig hinausschieben müssen. Allerdings kommen diese oxydablen Substanzen nach dem Erhitzen mit Schwefelsäure nur zu einem geringen Teil zur Wirkung, immerhin bleibt ihr Einfluß noch groß genug, ganz abgesehen davon, daß die Titrierung ohne vorgängige Reinigung — bei Rinderharn — überhaupt kaum ausführbar ist.

Es fragt sich nun noch, ob durch die richtig ausgeführte

Reinigung — nach Ellinger — die störenden, die Endreaktion hinauschiebenden Substanzen vollständig entfernt werden.

Zur Beantwortung dieser Frage hat man nur nötig, die Reinigung soweit auszuführen, daß man sie für abgeschlossen erachtet, dann noch einmal warmes Wasser aufzugießen und zu sehen, ob die so erhaltene Spülflüssigkeit noch einen Einfluß auf die Titrierung von Indigolösung ausübt.

Die vierte Ellingersche Spülflüssigkeit — ca. 10 ccm — wurde zu 10 ccm der Indigokarminlösung gesetzt und wie gewöhnlich verfahren. Es wurden erfordert 10,8 ccm, also nur ein sehr geringes Plus. Erwägt man nun, daß dieses Minimum ja auch nicht als solches, sondern als Sulfosäure zur Wirkung kommt, so wird sein Einfluß gleich Null zu setzen sein. Dieses ergab nun auch ein einschlägiger Versuch, bei dem diese Flüssigkeit mit Äther ausgeschüttelt und der beim Verdunsten der Ätherlösung bleibende kaum sichtbare Rückstand mit Schwefelsäure erhitzt, dann Indigokarminlösung hinzugesetzt und titriert wurde. Die Differenz zu reiner Indigokarminlösung blieb zweifelhaft.

Hiermit ist also bewiesen, daß die Indigotitrierung auch bei den besonders schwierigen Verhältnissen, wie sie der Rinderharn bietet, ausführbar und daß man berechtigt ist, den Verbrauch an Kaliumpermanganat ausschließlich auf das Indoxyl zu beziehen.

Im Prinzip halte ich freilich die kolorimetrische Methode für die bessere: es scheint mir richtiger zu sein, für die quantitative Bestimmung eines aus einem so komplizierten Gemisch isolierten Körpers eine spezifische Eigenschaft — die Färbung — zu benutzen, als eine so allgemeine, wie die Oxydierbarkeit. Es ist richtig, daß man bei der kolorimetrischen Methode nur Annäherungswerte bekommt, aber man hat nicht zu befürchten, daß man einmal wesentlich falsche Werte erhält. Bei der Oxydationsmethode ist dagegen die Möglichkeit, daß namentlich aus pathologischen Harnen Substanzen in den Chloroformauszug übergehen, welche durch die «Reinigung» nicht zu entfernen sind, nicht von der Hand zu weisen und wir haben kein Mittel, eine solche Verunreinigung zu erkennen. Andererseits muß zugegeben werden, daß die Gefahr eine sehr geringe ist

und daß gegen das kolorimetrische Verfahren noch der Umstand spricht, daß man die Vergleichslösung sehr häufig erneuern muß — ohne das geht es nicht, die Lösungen verändern ihre Farbe beim Aufbewahren ziemlich rasch —; das ist eine ganz beträchtliche Unbequemlichkeit. Vielleicht könnte man der Vergleichsindigolösung eine intensiv blaue Lösung, z. B. schwefelsaures Kupferoxydammoniak substituieren oder eine mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung von indigschwefelsaurem Natron benutzen, die viel haltbarer zu sein scheint, als die Chloroformlösung des Indigblaues und den Vergleich in der schwefelsauren Lösung vornehmen. Die Titriermethode wird indessen wohl ihr Übergewicht behaupten, außer in manchen klinischen Fällen, wo es sich mehr um Schätzungen als um quantitative Bestimmungen handelt und die Schätzungen für den beabsichtigten Zweck ausreichend sind. Übrigens würde es wohl auch ausführbar sein, das Indigblau in ein und derselben Lösung sowohl kolorimetrisch als auch durch Oxydation zu bestimmen.

Die Quantität des Indoxyls im Rinderharn ist ebenfalls bedeutend geringer als im Pferdeharn. Die Bestimmung des Indigos ergab¹⁾ nur 27,38 mg Indigo im Liter = 27,8 mg Indoxyl. Dagegen fand Jaffé²⁾ im Pferdeharn bis 220 mg Indigo im Liter. Eine genauere Vergleichung ist nicht möglich, da es an Stickstoffbestimmungen neben den Indigobestimmungen fehlt, jedenfalls aber ist die Differenz zwischen Rinderharn und Pferdeharn für das Indoxyl noch größer als für das Phenol, resp. Kresol.

Die Unterlagen für die Berechnung des im Darmkanal zerfallenden Eiweißes aus der Indikanausscheidung ist fast noch unsicherer, wie für das Phenol.

Die erste Voraussetzung für diese Berechnung ist die Größe der Indolgruppe im Eiweiß. Während die Größe der Phenolgruppe ziemlich feststeht und wenig schwankt zwischen den einzelnen Eiweißkörpern, scheint die Größe der Indolgruppe erheblichen Schwankungen zu unterliegen, wenn man nicht

¹⁾ Ohne die Korrektur nach Ellinger.

²⁾ Meissners Jahrb. f. Anat. u. Physiol. für 1870, S. 176.

annehmen will, daß diese Differenzen nur auf Unvollkommenheit der Methode zurückzuführen sind. Die in den Fäulnisversuchen von meinem Bruder und mir¹⁾ erhaltenen Maximalausbeuten an Indol betragen für

Blutfibrin	1,15%
Eiweißkörper des Fleisches	0,58%
Fleischfibrin	0,38%
Eiweißkörper des Serums	0,50%
Pankreaspepton	0,61%

Für die pflanzlichen Eiweißkörper liegen meines Wissens überhaupt keine quantitativen Angaben vor.

Legen wir der Berechnung den beim Blutfibrin erhaltenen Maximalwert zugrunde, so würde 1 g Indol aus 86,96 g zersetzten Eiweiß stammen.

Es fragt sich nun, wieviel von der im Darm abgespaltenen Indolgruppe als Indoxyl im Harn erscheint.

Nach den von Wang²⁾ an Hunden angestellten Fütterungsversuchen mit Indol findet sich etwa die Hälfte des verfütterten Indols als Indoxyl im Harn wieder. Das in 1 l Rinderharn gefundene Indoxyl würde unter Zugrundelegung dieser Annahmen aus 4,26 g durch Fäulnis zersetztem Eiweiß hervorgegangen sein. Da 1 l des Harns 7,5 g N enthält, entsprechend den Zersetzungsprodukten von 46,575 g Eiweiß, so ist etwa $\frac{1}{11}$ dieses Eiweißes im Darmkanal durch Fäulnis zerfallen, während sich aus der Kresolausscheidung $\frac{2}{3}$ berechnet, oder wenn wir annehmen, daß nichts von dem resorbierten Kresol oxydiert ist — eine durchaus unwahrscheinliche Annahme — $\frac{1}{3}$ von Übereinstimmung ist also keine Rede.

Die Unterlagen der ganzen Berechnung sind aber, wie gesagt, sehr unsicher. Einerseits liefert das pflanzliche Eiweiß möglicherweise viel weniger Indol, andererseits ist es fraglich, ob die bei der bakteritischen Zersetzung des Eiweißes frei werdende Indolgruppe wirklich zur Hälfte als Indoxyl im Harn erscheint, dieser Anteil nicht vielleicht viel geringer ist. Das Verhalten eingegebenen Indols ist hierfür nicht unbedingt be-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 430 u. ff.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 557.

weisend. Es ist wohl anzunehmen, daß das Indol zuerst als Skatolaminoessigsäure (Tryptophan) abgespalten wird. Ellinger und Gentzen¹⁾ haben nun zwar nachgewiesen, daß die Skatolaminoessigsäure im Dickdarm des Kaninchens Indol bildet, andererseits aber hat Ellinger²⁾ gefunden, daß die Skatolaminoessigsäure im Organismus des Hundes in Kynurensäure übergeht. Beim Hund kann man also sicher aus der Quantität des Indoxyls im Harn allein keinen Rückschluß mehr auf die Quantität des gebildeten Indols machen. Der Pflanzenfresserharn enthält allerdings keine Kynurensäure, aber seitdem Ellinger nachgewiesen, daß ein Teil der im Eiweiß steckenden Indolgruppe in einer ganz unerwarteten Weise verändert wird, ist doch auch die Sicherheit des Schlusses aus dem Indoxyl auf das Indol überhaupt stark erschüttert, beziehen sich doch ohnehin die Angaben von Wang über das Verhalten von verfüttertem Indol auf den Hund; ob es sich beim Rind ebenso verhält, wissen wir nicht. Kurz — es fehlt hier überall noch an Untersuchungen, welche erst die Grundlage zu geben hätten. Dabei sehen wir, je größer die Summe unserer Kenntnisse über den Stoffwechsel verschiedener Tierspezies wird, je mehr Einzelheiten wir kennen lernen, immer mehr, daß die Differenzen im Stoffwechsel viel größer sind, als wir früher annahmen; die Berechtigung der Übertragung der Erfahrungen von einer Tierspezies auf die andere wird also immer zweifelhafter. Die allgemeine Einteilung der Säugetiere hinsichtlich der Stoffwechselverhältnisse in Fleischfresser und Pflanzenfresser ist für die Erforschung des tierischen Stoffwechsels gewiß förderlich gewesen, allein, daß sie von den Tatsachen überholt ist und nicht mehr ausreicht, wissen wir lange. Vorläufig wird man eine Übertragung von einer Tierspezies auf die andere möglichst vermeiden müssen. Einer späteren Forschung wird es vielleicht gelingen, Gruppen von Tierspezies festzustellen, deren Stoffwechselverhältnisse gewisse gemeinsame Züge tragen; vielleicht werden sich hierbei phylogenetische Anschauungen fruchtbar und förderlich erweisen.

¹⁾ Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Path., Bd. IV, S. 171.

²⁾ Ber. d. d. chem. Gesellschaft, Bd. 37, S. 1801.

Leider ist mir erst nach Abschluß meiner Beobachtungen über die Indigobestimmung durch die Abhandlung von Maillard in dieser Zeitschrift Bd. XXXX, S. 436 bekannt geworden, daß dieser Autor früher angegeben hat, die Chloroformlösung des Indigos durch Ausschütteln mit ganz verdünnter Natronlauge (1 : 1000) zu reinigen. Die Monographie von Maillard: «L'indoxyle urinaire etc.», in der diese Angabe enthalten ist, war mir leider entgangen. Ich habe dieses Verfahren daher nicht in Betracht ziehen können. A priori erscheint es sehr zweckmäßig.