

Über die Gruppe von stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn enthalten sind.

Von

Hans Liebermann.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Mai 1907.)

Im Jahre 1902 gelang O. Thiele mittelst der Siegfriedschen Eisenmethode die Isolierung der Uroferrinsäure aus normalem Harn;¹⁾ nach den Analysen wurde für diese Säure als einfachste Formel aufgestellt: $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$. Die Uroferrinsäure gibt keine der für Eiweiß charakteristischen Farbenreaktionen, nach ihrem ganzen Verhalten und den Ergebnissen der allerdings noch nicht genügend studierten Spaltung ist sie aber wohl als «eine eiweißähnliche Substanz zu betrachten, d. h. die Uroferrinsäure ist wahrscheinlich aus der Zertrümmerung des großen Eiweißmoleküls hervorgegangen, jedoch unter Verlust gewisser, den echten Eiweißkörpern und ihren direkten Abkömmlingen, als Albumosen und Peptonen besonders eigentümlichen Atomkomplexe».²⁾ Die Uroferrinsäure enthält ihren Schwefel sowohl in Form von Ätherschwefelsäure wie als neutralen Schwefel, jedoch keinen, der durch Erhitzen mit Alkali als Schwefelwasserstoff abspaltbar ist.

Bondzynski, Dombrowski und Panek suchen nun am Schlusse ihrer Arbeit: «Über die Gruppe von stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn enthalten sind»,³⁾ die Existenz der Uroferrinsäure im Harn in Frage zu stellen. Nach ihren Versuchen kommt im Harn eine organische Säure, die wie die Uroferrinsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 251, u. Dissertation, Leipzig 1902.

²⁾ Zitiert nach O. Thiele, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 232.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 83.

ein wasserunlösliches Mercuri- und basisches Bleisalz und ein wasserlösliches, alkoholunlösliches Baryumsalz bildet und dabei Schwefel in der Form von Ätherschwefelsäure enthält, nicht vor. Sie betrachten die Uroferrinsäure als ein Zersetzungsprodukt einer oder beider Säuren, die in der rohen Alloxyproteinsäure enthalten sind: der Alloxyproteinsäure selbst und des Urochroms. Die von Bondzynski und seinen Mitarbeitern beschriebene Alloxyproteinsäure sowie ihr Urochrom weisen in ihren Salzen vielfache Ähnlichkeiten mit der Uroferrinsäure auf, unterscheiden sich aber von ihr durch die Bindungsart ihres Schwefels: sie enthalten keinen Schwefel in Form von Ätherschwefelsäure, und ferner ist ihr Schwefel, wenigstens zum Teil, mit Alkali abspaltbar. Alloxyproteinsäure und Urochrom sind schon verdünnten Mineralsäuren gegenüber in der Wärme wenig beständig. Im Gange der Darstellung der Uroferrinsäure hat Thiele den mit Ammonsulfat gesättigten Harn mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, ferner hat er den die Uroferrinsäure enthaltenden Eisenniederschlag mit verdünnter Schwefelsäure in der Wärme gelöst. Bei dieser Behandlung soll das ursprüngliche Urochrom zum größeren Teile zerlegt und zwar teilweise gespalten, teilweise durch Ferrisalze oxydiert worden sein. «Die Methode war aber auch imstande, eine Addition der Schwefelsäure zustande zu bringen». Zu diesen Ausführungen Bondzynskis und seiner Mitarbeiter möchte ich bemerken, erstens, daß eine derartige Addition von Schwefelsäure sehr unwahrscheinlich ist und zweitens, daß Thiele den Eisenniederschlag, der die Uroferrinsäure enthielt, mit verdünnter Schwefelsäure in der Kälte und nicht in der Wärme gelöst hat. Die Lösung wurde dann allerdings vor dem Zufügen von Ammoniak auf dem Wasserbade gelinde erwärmt; wie ich mich aber bei der Neudarstellung der Uroferrinsäure durch eigene Versuche überzeugt habe, bläute diese Lösung, da bloß die ausreichende Menge Schwefelsäure angewandt war, Kongopapier nicht, war also nicht mineralsauer.

Diese Arbeit Bondzynskis, Dombrowskis und Paneks, die die Uroferrinsäure als primären Harnbestandteil in Zweifel zog aus Gründen, die nicht als stichhaltig zu bezeichnen sind,

war die Veranlassung, daß Herr Professor Siegfried, unter dessen Leitung auch Thieles Arbeit über Uroferrinsäure ausgeführt war, mich damit betraute, die Uroferrinsäure selbst einer neuen Untersuchung zu unterziehen, wie auch die Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe nach den Angaben Bondzynskis und seiner Mitarbeiter darzustellen und auf Ätherschwefelsäure sowie ihre Beziehungen zur Uroferrinsäure zu untersuchen. Diese Untersuchung schien um so aussichtsreicher, als ich mich durch verschiedene Versuche überzeugt hatte, daß entgegen der Behauptung Bondzynskis, Dombrowskis und Paneks normaler Menschenharn regelmäßig eine oder mehrere Verbindungen vom Charakter eines Schwefelsäureesters enthält, die wasserunlösliche Mercurisalze und wasserlösliche, alkoholunlösliche Baryumsalze bilden.

Versuche, die beweisen, daß im normalen Menschenharn Substanzen vom Charakter eines Schwefelsäureesters vorkommen, die wasserunlösliche Mercurisalze und wasserlösliche, alkoholunlösliche Baryumsalze bilden.

Diese Versuche wurden genau nach den kurzen Angaben Bondzynskis und seiner Mitarbeiter ausgeführt.¹⁾

Versuch I. Es wurden 10 l Harn in vacuo bei 30—40° eingedampft. Der ca. 1/4 l betragende sirupöse Rückstand wurde mit 600 ccm Alkohol + 200 ccm Äther extrahiert, von dem Niederschlage filtriert und das schön rote Filtrat nach Entfernen des Äthers und Alkohols in vacuo mit Mercuriacetatlösung gefällt; es wurden dazu 280 g Mercuriacetat in 20%iger Lösung verwandt. (Zur vollständigen Ausfällung sind nahezu 800 g erforderlich.) Durch Abstumpfen der sauren Reaktion mit Soda wurde die Menge des Quecksilberniederschlages noch vermehrt. Dieser wurde nun abgesaugt, gut ausgewaschen, mit Wasser verrührt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das schwach gelbe Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und nach Zusatz einiger Tropfen Phenolphthalein mit Barytwasser bis zur Rotfärbung versetzt. Die durch Kohlensäure vom überschüssigen

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

Baryt befreite Lösung ward in vacuo auf ca. 150 ccm konzentriert, filtriert und mit 1200 ccm Alkohol gefällt. Es schieden sich fast 40 g eines gelblichweißen Salzgemisches ab, das zum weitaus größten Teile aus den Baryumsalzen anorganischer Säuren bestand. In diesem Gemisch wurde der Gesamtschwefel durch Schmelzen mit Natriumhydroxyd und Salpeter, der in Form von Ätherschwefelsäure vorhandene Schwefel folgendermaßen bestimmt: Zu der wässrigen Lösung der Substanz (auf 4 g etwa 15 ccm Wasser) wurde das anderthalbfache Volumen 25%iger Salzsäure gesetzt und ohne Rücksicht auf das ausgeschiedene Chlorbaryum zehn Minuten über freier Flamme gekocht. Dann wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, aufgeköcht und nach 12stündigem Stehen der dunkle Niederschlag abfiltriert. Derselbe ließ beim Einäschern im Platintiegel reines Baryumsulfat zurück. Hiervon überzeugte ich mich wiederholt dadurch, daß ich den Glührückstand mit Natrium-Kaliumcarbonat schmolz und in dem Filtrat der mit heißem Wasser ausgezogenen Schmelze die Schwefelsäure mit Chlorbaryum als Baryumsulfat bestimmte; hierbei fand ich bis auf Bruchteile eines Milligramms das gleiche Gewicht wie vorher für den Glührückstand. Selbstverständlich habe ich auch mehrfach durch blinde Versuche festgestellt, daß Wasser wie Salzsäure, die zur Anwendung kamen, vollkommen frei von Schwefelsäure waren.

Nach diesen Methoden wurden folgende Werte gefunden:

Gesamtschwefel:	2,660 g	gaben	0,0382 g	BaSO ₄	=	0,197 %
Ätherschwefelsauren Schwefel:	I. 4,024 »	»	0,0160 »	»	=	0,054 %
»	»	:	II. 7,460 »	»	=	0,047 %

Versuch II. Bei einer zweiten Darstellung eines solchen Barytsalzgemisches aus 3 l Harn, die nur mit dem Unterschiede ausgeführt war, daß das Harnextrakt quantitativ mit Mercuriacetat gefällt war, wurden ca. 20 g eines Präparates gewonnen, das folgende Zahlen gab:

Gesamtschwefel:	3,591 g	gaben	0,0366 g	BaSO ₄	=	0,140 % S
Ätherschwefelsauren Schwefel:	I. 6,869 »	»	0,0178 »	»	=	0,036 % »
»	»	:	II. 6,516 »	»	=	0,036 % »

Diese Analysen lehren, daß von dem in einem solchen Barytsalzgemisch enthaltenen organischen Schwefel etwa der vierte Teil in Form von Ätherschwefelsäure vorhanden ist.

Alloxyproteinsäure.

Bei der Darstellung der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe hielt ich mich im wesentlichen genau an die Vorschrift Bondzynskis, Dombrowskis und Paneks.

325 l Harn, den ich aus der hiesigen Anstalt für taubstumme Kinder bezog, wurden bei 50—60° auf Wasserbädern zu einem dünnen Sirup eingedampft. Zu diesem von den in großer Menge ausgeschiedenen Sedimenten abgossenen, bzw. abgesaugten Sirup, dessen Volumen etwa 7 l betrug, wurde bei gewöhnlicher Temperatur unter Rühren 35%ige Schwefelsäure bis zur Bläuung von Kongopapier zugefügt. Die Flüssigkeit wurde nun mit 12 l Alkohol verrührt. Nach längerem Stehen wurde von den wesentlich aus Alkalisulfaten bestehenden Ausscheidungen abgesaugt und mit 70%igem Alkohol nachgewaschen. Aus dem dunkelbraunen Filtrat wurde der Alkohol im luftverdünnten Raume bei 30—35° fortgedampft. Die restierende sirupöse Flüssigkeit ward in Schwartzschen Apparaten mit Äther extrahiert. Die durch die Ätherextraktion von stickstoffhaltigen, aber schwefelfreien organischen Säuren befreite Flüssigkeit wurde nun auf die Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe verarbeitet, meist in Portionen von einem Liter entsprechend etwa 45 l Harn.

Hierbei schien eine kleine Abweichung von dem Verfahren Bondzynskis und seiner Mitarbeiter geboten. Letztere fällten die Flüssigkeit mit Barytwasser, leiteten darauf, ohne erst vorher zu filtrieren, zur Ausfällung des überschüssigen Baryts Kohlensäure ein und filtrierten dann von dem gesamten Barytniederschlag. Bei diesem Verfahren mußte ihnen die gleich zu erwähnende Beobachtung entgehen. Ich verfuhr folgendermaßen: Zu einem Liter des mit Äther extrahierten Harnsirups fügte ich Barytwasser bis zur alkalischen Reaktion gegen Phenolphthalein. Von dem Niederschlage wurde abgesaugt und in das Filtrat Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion eingeleitet: es

fiel kein Baryumcarbonat aus. Um durch Einleiten von Kohlensäure in der Flüssigkeit in der Kälte eine Fällung hervorzu- bringen, ist noch Zusatz etwa der gleichen Menge Barytwasser erforderlich, wie zu dem mit Äther extrahierten Sirup zuge- setzt war. Diese noch nicht näher studierte Erscheinung läßt sich vielleicht durch die Bildung löslicher Baryumsalze von Carbaminosäuren¹⁾ erklären.

Nun wurde in vacuo auf ca. 700 ccm eingedampft, der sirupöse Rückstand längere Zeit in der Kälte stehen gelassen zur Abscheidung von Chlornatrium. Das Filtrat vom Chlor- natrium wurde mit fein gepulvertem Baryt versetzt, bis eine Probe des mit Wasser verdünnten Sirups mit Phenolphthalein gerade schwache Rosafärbung zeigte, und dann in 5 Liter Alkohol einlaufen gelassen. Der abgesaugte, mit Alkohol ausgewaschene Niederschlag, der große Neigung zum Verharzen zeigt, wurde in Wasser gelöst, filtriert und das schön rote Filtrat mit Blei- essig quantitativ gefällt.

Der gut mit Wasser ausgewaschene Bleiniederschlag wurde in zwei nacheinander folgenden Operationen mit Oxalsäure zerlegt, wobei für die erste Operation etwa der sechste Teil der zur vollständigen Zersetzung notwendigen Menge Oxalsäure ange- wandt wurde. Das erste der bei diesen Zerlegungsprozessen erhaltenen Filtrate, das mit «Autoxyproteinsäure» verunreinigt ist, wurde verworfen; aus dem zweiten wurden genau nach den Angaben Bondzynskis und seiner Mitarbeiter die Calciumsalze und aus diesen die Baryumsalze der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe dargestellt. Auf das Auswaschen der Niederschläge des rohen Calcium- und Baryumalloxyproteinats mit Alkohol wurde größte Sorgfalt verwandt.

So wurden aus 45 Liter Harn etwa 15 g eines gelblich- weißen Baryumsalzes erhalten; dasselbe war vollkommen chlor- frei, gab Ehrlichsche Diazoreaktion nur ganz schwach; in Wasser löste es sich mit roter Farbe; es enthält Schwefel, und zwar ist ein kleiner Teil des Schwefels mit Alkali abspaltbar, wie Bondzynski und Mitarbeiter auch angeben. Dagegen habe

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 85, u. Bd. XLVI, S. 401. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 397.

ich im Gegensatz zu ihnen nachgewiesen, daß es auch Schwefel in Form von Ätherschwefelsäure enthält.

Schwefelbestimmungen des rohen alloxyproteinsauren Baryums:

Gesamtschwefel:	0,4600 g	gaben	0,0365 g	BaSO ₄	=	1,09 % S
Ätherschwefelsauren Schwefel: I.	0,3210 »	»	0,0088 »	»	=	0,37 % »
»	»	:	II. 0,6290 »	»	=	0,37 % »

Die Spaltung der Ätherschwefelsäure geschah auch bei diesen und den folgenden Analysen durch 10 Minuten langes Kochen mit starker Salzsäure.

Nach Feststellung der Gegenwart von Ätherschwefelsäure in dem Baryumsalze der rohen Alloxyproteinsäure schien eine Prüfung auf darin enthaltene Uroferrinsäure bei den ähnlichen Eigenschaften ihrer Salze nicht aussichtslos. Zu diesem Zwecke wurde der folgende Versuch angestellt: 12 g rohes Baryumalloxyproteinat wurden in Wasser gelöst und das Baryum mit Ammonsulfatlösung ausgefällt. Das schön rote Filtrat wurde mit Ammonsulfat in der Kälte gesättigt, dazu 1 ccm mit Ammonsulfat gesättigter, 10%iger Schwefelsäure gesetzt und nun mit Ammonsulfat gesättigte Eisenammoniakalaunlösung zugefügt, so lange noch eine Fällung entstand. Es fiel ein hellbrauner Niederschlag aus, der abfiltriert und mehrmals mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen wurde. Derselbe wurde mit Wasser verrieben und durch Zusatz einiger Kubikzentimeter 10%iger Schwefelsäure gelöst; zu dieser roten Lösung wurde fein gepulverter Baryt zur Ausfällung der Schwefelsäure und des Eisens zugesetzt. Aus dem gelbroten Filtrat wurde durch Ammoncarbonat der überschüssige Baryt ausgefällt. Das Filtrat von Baryumcarbonat wurde in vacuo auf etwa 25 ccm konzentriert, filtriert, mit 80 ccm Alkohol und 1/2 ccm Eisessig versetzt und diese Lösung eintropfen gelassen in ein Gemisch von 300 ccm Alkohol und 200 ccm Äther. Es fiel ein gelblicher, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt, mit Alkohol-Äther, zuletzt mit Äther gewaschen und sogleich in vacuo über Schwefelsäure getrocknet wurde. Das Gewicht der trocknen Substanz, die stark zum Verharzen neigte, betrug 0,7 g; sie enthält neutralen und Ätherschwefelsäureschwefel, aber keinen mit Alkali abspaltbaren.

Gesamtschwefel: 0,2040 g gaben 0,0429 g $\text{BaSO}_4 = 2,9\%$ S.

Die Substanz verhält sich wie Uroferrinsäure, so daß es wohl keinem Zweifel unterliegt, daß in ihr allerdings noch nicht ganz reine Uroferrinsäure vorliegt. —

Aus dem Baryumsalz der Säuren der Alloxyproteinsäurereihe habe ich nun nach der Vorschrift Bondzynskis und seiner Mitarbeiter sogenanntes reines alloxyproteinsaures Baryum dargestellt. Bei einer solchen Darstellung wurde z. B. so verfahren: 50 g rohes Baryumalloxyproteinat wurden in 200 ccm Wasser gelöst, das Baryum mit Sodalösung ausgefällt, vom Baryumcarbonat abfiltriert, das schön rote Filtrat schwach mit Essigsäure angesäuert und soviel 20%ige Mercuriacetatlösung zugefügt, bis die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit fast wasserklar war; dazu waren 65 ccm Mercuriacetatlösung nötig. Von dieser braunen Quecksilberfällung I, von der später noch bei Besprechung des «Urochroms» die Rede sein wird, wurde abgesaugt, das Filtrat mit Sodalösung neutralisiert und mit Mercuriacetatlösung ausgefällt (gebraucht ca. 120 ccm 20%iger Lösung). Der so entstandene Quecksilberniederschlag II war gelblichweiß. Durch Neutralisieren des Filtrats dieser Quecksilberfällung II mit Soda ließ sich noch eine weiße Fällung III erzeugen.

Die Quecksilberniederschläge II und III wurden gut ausgewaschen, mit Wasser verrührt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde durch Durchleiten von Luft vom Schwefelwasserstoff befreit und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt zur endgültigen Entfernung stickstoffhaltiger, schwefelfreier organischer Säuren; in den Äther gingen bloß Spuren über. Die so erhaltene Lösung der freien «Alloxyproteinsäure» wurde nun zur Überführung in das Baryumsalz mit Barytwasser versetzt, der geringe Barytüberschuß durch Kohlensäure ausgefällt, das Filtrat vom Baryumcarbonat in vacuo auf ca. 150 ccm konzentriert und in ca. 1200 ccm Alkohol einlaufen gelassen. Das Baryumsalz der «Alloxyproteinsäure» fiel dabei in weißen Flocken aus; die Ausbeute an trockner Substanz betrug bloß 8 g.

Das so dargestellte «Baryumalloxyproteinat» gab mit Eisen-

chlorid keinen Niederschlag; es enthielt neben mit Alkali abspaltbarem Schwefel auch Schwefel in Form von Ätherschwefelsäure.

Zur Analyse wurde die Substanz im Siegfriedschen Trockenapparate, dessen Heizkörper mit Alkohol gefüllt war, also bei etwa 75° , unter Durchleiten trockner Luft getrocknet, bis Gewichtskonstanz erreicht war.

Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmungen:

0,1630 g gaben 0,1720 g CO_2 und 0,0496 g H_2O = 28,78% C und 3,38% H
 0,1492 » » 0,1580 » » » 0,0460 » » = 28,88% » » 3,43% »

Stickstoffbestimmung:

0,1400 g gaben 9,8 ccm N bei 12° und 772 mm = 8,44% N.

Baryumbestimmungen:

0,1566 g gaben 0,0846 g BaSO_4 = 31,76% Ba
 0,1650 » » 0,0900 » » = 32,06% »

Bestimmung des Gesamtschwefels:

0,4478 g gaben 0,0464 g BaSO_4 = 1,42% S.

Bestimmungen des Ätherschwefelsäureschwefels:

0,4340 g gaben 0,0134 g BaSO_4 = 0,42% S
 0,4100 » » 0,0155 » » = 0,52% »
 0,4110 » » 0,0130 » » = 0,43% »

Bondzynski und seine Mitarbeiter haben außer dem Baryumsalze der «Alloxyproteinsäure» auch ihr Silbersalz dargestellt und analysiert. Sie fanden für:

Alloxyproteinsaures Baryum:

23,59% C 3,31% H 7,89% N 1,33% S 35,38% Ba

Alloxyproteinsaures Silber (im Mittel):

23,33% C 2,82% H 7,65% N 1,24% S 43,96% Ag

Wie man sieht, zeigen die von mir für alloxyproteinsaures Baryum erhaltenen Analysenzahlen gegenüber den von Bondzynski und seinen Mitarbeitern gefundenen große Abweichungen. Wären nun die von letzteren untersuchten beiden «Alloxyproteinate» Salze einer einheitlichen, reinen Säure, so müßte sich aus den Prozentzahlen dieser beiden Salze für die freie Säure die gleiche Zusammensetzung berechnen. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie folgende Übersicht lehrt.

Berechnet für Alloxyproteinsäure aus dem von Bondzynski analysierten

Baryumsalz:

36,21% C 5,88% H 12,11% N 2,04% S 43,75% O

Berechnet für Alloxyproteinsäure aus dem von Bondzynski analysierten

Silbersalz:

41,33% C 5,70% H 13,55% N 2,20% S 37,22% O

Da hiernach, wie auch noch aus anderen Gründen, die ich am Schlusse dieses Abschnittes zusammenstelle, die «Alloxyproteinsäure» nicht als eine einheitliche Substanz zu betrachten ist, so ist es auch nicht zu verwundern, daß ich für das «alloxyproteinsaure Baryum» andere Zahlen erhalten habe als Bondzynski und seine Mitarbeiter. Die von mir für das «alloxyproteinsaure Baryum» gefundenen Zahlen nähern sich übrigens — jedenfalls viel mehr als die von Bondzynski und Mitarbeitern gefundenen — den Zahlen, die sich ergeben, wenn man aus der Zusammensetzung des Bondzynskischen Silberalloxyproteinates diejenige des Baryumalloxyproteinates berechnet, wie folgende Tabelle zeigt:

Ba-Alloxyproteinat Bondzynskis:

23,59% C 3,31% H 7,89% N 1,33% S 35,38% Ba

Ba-Alloxyproteinat ber. aus mittl. Zus. des Ag-Salzes Bondzynskis:

27,80% C 3,36% H 9,11% N 1,48% S 33,24% Ba

Von mir dargestelltes Ba-Alloxyproteinat im Mittel:

28,83% C 3,40% H 8,44% N 1,42% S 31,91% Ba

Die Feststellung des Vorhandenseins gepaarter Schwefelsäure in der gereinigten «Alloxyproteinsäure» veranlaßte mich, zu untersuchen, ob auch in ihr eine mit Eisenammoniakalaun aus ammoniumsulfat gesättigter Lösung fällbare Substanz enthalten sei. Zu diesem Zwecke wurden 3,8 g gereinigtes «Baryumalloxyproteinat» in Wasser gelöst, das Baryum mit Ammonsulfatlösung ausgefällt, das Filtrat vom Baryumsulfat mit Ammonsulfat gesättigt, mit einigen Tropfen 25%iger Schwefelsäure angesäuert und nun eine mit Ammonsulfat gesättigte Lösung von Eisenammoniakalaun zugesetzt, so lange noch eine Fällung entstand. Diese hellbraune Fällung wurde abgesaugt, mit Ammonsulfatlösung gewaschen und dann in etwa 30 ccm Wasser unter Zusatz eines Kubikzentimeters 25%iger Schwefelsäure gelöst. Schwefelsäure und Eisenhydroxyd wurden aus der Lösung durch Baryt entfernt und der überschüssige Baryt aus dem Filtrat durch Ammoncarbonatlösung ausgefällt. Das Filtrat vom Baryumcarbonat wurde in vacuo bei 30° auf ca. 10 ccm gelblicher Flüssigkeit eingedampft, die filtriert, mit 40 ccm Alkohol + 1 ccm Eisessig versetzt und in ein Gemisch von 100 ccm Alkohol und 100 ccm Äther getropft wurde. Dabei fiel eine gelblichweiße

Substanz in Flocken aus, die sogleich abgesaugt, mit Äther gewaschen und in vacuo über Schwefelsäure getrocknet wurde. Die Substanz verhält sich wie Uroferrinsäure; sie enthält keinen mit Alkali abspaltbaren Schwefel, während Ätherschwefelsäure qualitativ nachgewiesen wurde. Zu Analysen reichte leider die geringe Menge dieser Substanz, die nur 0,25 g betrug, nicht aus.

Ergebnisse der Untersuchung der «Alloxyproteinsäure».

I. Die «Alloxyproteinsäure» enthält einen Teil ihres Schwefels in Form von Ätherschwefelsäure.

II. Die «Alloxyproteinsäure» ist keine einheitliche Substanz.

1. Bondzynski und seine Mitarbeiter haben für die Einheitlichkeit der «Alloxyproteinsäure», die sie nicht in freiem Zustande, sondern bloß in Form ihrer Salze dargestellt haben, keine Beweise gegeben, wie sie bei solchen Substanzen in erster Linie systematische Durchführung fraktionierter Fällung und Nachweis der gleichen Zusammensetzung der dabei gewonnenen Präparate bietet. Zwar haben sie¹⁾ 4 Präparate des «alloxyproteinsauren» Silbers aus einer «größeren Zahl von — weißen — Quecksilberfällungen» der rohen «Alloxyproteinsäure» dargestellt. Von diesen Präparaten haben sie jedoch bloß ein einziges vollständig analysiert; und die Unterschiede im Silbergehalt, den sie in diesen vier Salzen bestimmt haben, sind zu bedeutend (bis 1,2%), um auf gleiche Zusammensetzung schließen zu lassen.

2. Die Analysenzahlen des von Bondzynski und seinen Mitarbeitern dargestellten reinen «alloxyproteinsauren» Baryums führen für die Zusammensetzung der «Alloxyproteinsäure» zu ganz anderen Werten als die Analysenzahlen des gleichfalls von ihnen dargestellten reinen «alloxyproteinsauren» Silbers. Es ist hiernach verständlich, daß ich bei der Analyse des nach ihren Angaben dargestellten reinen «alloxyproteinsauren» Baryums zu anderen Zahlen gekommen bin wie sie.

3. Durch Fällen mit Eisenammoniakalaun gelang es mir, aus der mit Ammonsulfat gesättigten Lösung der «Alloxyproteinsäure»

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 109.

säure» eine Substanz zu isolieren, die sich wie Uroferrinsäure verhält.

Urochrom.

Durch Fällen der roten Lösung des rohen Calciumalloyproteins mit Kupferacetatlösung haben Bondzynski und Mitarbeiter das Kupfersalz einer Substanz dargestellt, die sie als Urochrom ansprechen. Da Verfasser, wie ich in der Einleitung ausgeführt habe, dies als eine der Muttersubstanzen der Uroferrinsäure annehmen, so habe ich auch ihre diesbezüglichen Versuche nachgeprüft.

Die rote Lösung dieses «Urochroms» gibt nach Bondzynski und Mitarbeitern fast sämtliche Reaktionen der Uroferrinsäure, enthält aber zum Unterschiede von ihr mit Alkali abspaltbaren Schwefel. Das «Urochrom» ist leicht spaltbar und leicht oxydabel. Bei Umrechnung der für das «Urochromkupfer» gefundenen Zahlen auf die freie Säure kommt man zu fast den gleichen Werten, die Thiele für die Uroferrinsäure gefunden hat.

Uroferrinsäure:	45,4%	C	6,1%	H	12,1%	N	3,5%	S
Berechnet für freies «Urochrom»:	45,6%	C	5,2%	H	12,1%	N	3,2%	S

Anmerkung: Aus den Analysenzahlen des Urochromkupfers (Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 124) berechnen sich für Stickstoff und Kupfer andere Prozentzahlen, als Bondzynski und Mitarbeiter angeben. Ich habe angenommen, daß die Analysenzahlen für Stickstoff und Kupfer durch Druckfehler entstellt sind, da diese in der Abhandlung bloß einmal, die gleichen Prozentzahlen in ihr aber zweimal vorkommen; letztere sind obiger Berechnung zugrunde gelegt.

Ich habe nun dies «Urochromkupfer» dargestellt teils aus dem Gemenge von Calciumsalzen der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe, teils aus dem roten Filtrat vom Schwefelquecksilber, das aus der ersten mit Wasser verrührten und mit Schwefelwasserstoff zersetzten braunen Quecksilberfällung der rohen Alloxyproteinsäure gewonnen war. Zu diesen eventuell mit Essigsäure ganz schwach angesäuerten Lösungen wurde eine Lösung von Kupferacetat gefügt, so lange noch ein Niederschlag entstand. Der sich nach kurzer Zeit absetzende flockige, graugrüne Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser, Alkohol,

zuletzt mit Äther gewaschen und zur Analyse bei ca. 75° im Siegfriedschen Trockenapparate mit Alkohol als Heizflüssigkeit bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Analysen des «Urochromkupfers», ausgeführt mit Substanz von verschiedenen Darstellungsweisen:

0,1662 g	gaben	0,2150 g	CO ₂	und	0,0600 g	H;	Rückstand	0,0440 g	CuO.
0,1380 »	»	11,8 ccm	N	bei	18,5°	und	761 mm.		
0,1745 »	»	0,2245 g	CO ₂	und	0,0617 g	H;	Rückstand	0,0466 g	CuO.
0,1986 »	»	0,2630 »	»	»	0,0618 »	»	»	0,0510 »	»
0,1766 »	»	0,2306 »	»	»	0,0575 »	»	»	0,0472 »	»
0,1524 »	»	13,7 ccm	N	bei	14°	und	753 mm.		
0,1004 »	»	0,0230 g	BaSO ₄ .						

Nach diesen Analysen berechnen sich					Bondzynski und Mitarbeiter
folgende Prozentzahlen:					fanden:
C =	35,32	35,1	36,12	35,62	36,76
H =	4,01	3,92	3,46	3,62	3,56
N =	9,88		10,5		9,72
Cu =	21,12	21,32	20,51	21,34	20,10
S =	3,15	—	—	—	2,57

Beim Zerlegen der wässerigen Suspension dieses «Urochromkupfers» mit Schwefelwasserstoff wurde eine rote Lösung erhalten, die die von Bondzynski und Mitarbeitern geschilderten Reaktionen zeigte.

Von Anfang an war es mir höchst unwahrscheinlich gewesen, daß in dem Gemenge von Calciumsalzen der Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe, das in trockenem Zustande schwach gelb gefärbt war, eine nennenswerte Menge Farbstoff, wie sie durch Fällung mit Kupferacetatlösung erhalten wurde, enthalten sein sollte. Auch die Farbtiefe der wässerigen Lösung dieser Calciumsalze deutete bloß auf die Anwesenheit geringer Mengen Farbstoffe hin. Den Beweis, daß in dem Bondzynskischen «Urochrom» dieser oder ein anderer Farbstoff nur in geringer Menge enthalten ist, daß es aber selbst kein Farbstoff ist, erbrachte ich folgendermaßen:

1,4 g «Urochromkupfer» wurden in wässeriger Suspension bei 45° mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das von dem Schwefelkupfer abgesangte rote Filtrat wurde bei 35° in vacuo auf 15 ccm eingedampft, von einer geringen Ausscheidung filtriert und das Filtrat nach dem Verdünnen mit 50 ccm Alkohol ein-

tropfen gelassen in ein Gemisch von 100 ccm Alkohol und 200 ccm Äther: hierbei schied sich eine Substanz in gelblichen Flocken ab. Die Substanz wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und sogleich in vacuo über Schwefelsäure getrocknet. Die trockene Substanz, von der 0,3 g erhalten wurden, ist gelblichweiß, sie zeigt starke Neigung zum Verharzen.

Die wässrige Lösung dieser Substanz, die allerdings gelbrot gefärbt ist, gibt nun fast sämtliche Reaktionen, die Bondzynski, Dombrowski und Panek für die wässrige Lösung ihres freien «Urochroms» angeben: gefärbte Fällungen mit Mercuriacetat, Silbernitrat, Kupferacetat, Eisenchlorid, Phosphorwolframsäure. Durch Erwärmen mit Natronlauge läßt sich ein kleiner Teil ihres Schwefels abspalten. Bei Zugabe zu einer Eisenchlorid und Ferricyankalium enthaltenden Lösung entsteht sogleich Berlinerblau.

Eine Prüfung dieser Substanz auf Ätherschwefelsäure erlaubte die geringe Menge nicht. Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Schwefelbestimmungen ergaben folgende Zahlen:

0,1228 g	gaben	0,2152 g	CO ₂	und	0,0654 g	H ₂ O	=	47,79%	C	u.	5,91%	H.
0,1010 »	»	0,0206 »	BaSO ₄				=	2,80%	S.			

Uroferrinsäure.

O. Thiele ist bei seinen Analysen von Uroferrinsäure, die mit Präparaten von verschiedener Darstellungsweise und — was noch entscheidender ist — mit umgefällter Substanz ausgeführt waren, wobei ein wesentlicher Teil in der Mutterlauge verblieb, zu den gleichen Werten gelangt; hiermit scheint die Einheitlichkeit der Uroferrinsäure bewiesen. Außerdem hat Thiele die verschiedenen Reaktionen der reinen Uroferrinsäure, die eine äußerst schwer zu handhabende Substanz mit großer Neigung zum Verschmieren darstellt, beschrieben. Ferner hat er, um einen Einblick in ihre Konstitution zu gewinnen, mehrere Spaltungsversuche ausgeführt, teils durch Kochen mit Salzsäure allein, teils unter Zusatz von Zinnchlorür; hierbei fand er, daß ein kleiner Teil des Schwefels als Schwefelwasserstoff, ein großer als Schwefelsäure abgespalten wird; ein geringer Teil des Stickstoffs wird als Ammoniak abge-

spalten; ferner konnte Thiele neben schwefelfreien «Melaninen» die Bildung von Asparaginsäure nachweisen, die von Benzoesäure sehr wahrscheinlich machen, außerdem feststellen, daß eine mit Phosphorwolframsäure fällbare Base entsteht, deren Charakterisierung ihm infolge der geringen Substanzmenge und der damals noch nicht so vollkommenen Methoden zur Isolierung der Hexonbasen allerdings nicht gelang.

Aus verschiedenen Gründen schien nun eine erneute Untersuchung der Uroferrinsäure wünschenswert. Ich habe zwar in dieser Abhandlung nachgewiesen, daß die im normalen Menschenharn vorkommenden stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, die, wie die Uroferrinsäure, wasserunlösliche Mercurisalze und wasserlösliche, alkoholunlösliche Baryumsalze bilden, einen Teil ihres Schwefels in Form von Ätherschwefelsäure enthalten, also auch der Ätherschwefelsäuregehalt der Uroferrinsäure selbst nicht auf eine Zersetzung zurückzuführen ist; doch zur endgültigen Widerlegung der in der Einleitung besprochenen Einwände Bondzynkis und seiner Mitarbeiter schien eine Neudarstellung der Uroferrinsäure unter Vermeidung der von ihnen in Thieles Darstellungsmethode beanstandeten Mängel erforderlich. Aber noch andere Gründe ließen eine neue Untersuchung der Uroferrinsäure erwünscht erscheinen. Thiele hat bei der Spaltung der Uroferrinsäure Asparaginsäure und eine mit Phosphorwolframsäure fällbare Base gefunden; bei den inzwischen bedeutend verbesserten Methoden zur Isolierung von Aminosäuren und Hexonbasen waren erneute Spaltungsversuche aussichtsreich; ließ sich doch aus ihrem Ergebnisse eine nähere Kenntnis der Beziehungen der Uroferrinsäure zu den Eiweißkörpern erhoffen. Ferner gedachte ich die Uroferrinsäure durch mehrmaliges Umfällen zu reinigen und die Präparate dieser verschiedenen Umfällungen zu vergleichen. Es wäre ja immerhin möglich, wenn auch höchst unwahrscheinlich, daß sich durch eine weitgehende Reinigung der Ätherschwefelsäurekomplex aus der Uroferrinsäure entfernen ließ.

Bevor ich die Neudarstellung der Uroferrinsäure in Angriff nahm, bestimmte ich nochmals den Ätherschwefelsäure-

gehalt der von Thiele dargestellten reinen Uroferrinsäure an einem Präparate, das mir Herr Prof. Siegfried gütigst zur Verfügung stellte.

Analyse I: 0,3058 g Uroferrinsäure wurden 10 Minuten über freier Flamme mit 15%iger Salzsäure gekocht, dann ward etwas Chlorbaryum zur Flüssigkeit zugefügt, die nun auf dem Wasserbade eingedampft wurde. Der Rückstand wurde mit 100 ccm Wasser, dem 1 ccm Salzsäure zugesetzt war, aufgenommen, aufgeköcht und nach längerem Stehen filtriert. Der eingeäscherte Niederschlag, der reines Baryumsulfat war, betrug 0,0215 g. Hieraus berechnet sich ein Gehalt von 0,97% Schwefel, der in Form von Ätherschwefelsäure in der Uroferrinsäure vorhanden ist.

Bei Analyse II wurde mit dem Unterschiede verfahren, daß zur Abspaltung der Schwefelsäure 12 Stunden mit konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler gekocht wurde. Es wurde der gleiche Wert wie bei Analyse I gefunden:

0,2970 g gaben 0,0214 g $\text{BaSO}_4 = 0,99\%$ ätherschwefelsauren Schwefel.

Ich teile diese Analysen mit, obgleich ich mir bewußt bin, daß ihnen kein definitiver Wert beizumessen ist, da sie mit recht geringen Substanzmengen ausgeführt wurden. Sobald ich wieder im Besitz einer größeren Menge Uroferrinsäure bin, sollen diese Bestimmungen mit mehr Substanz wiederholt werden.

Der von Thiele gefundene Wert für den Gehalt der Uroferrinsäure an Ätherschwefelsäure erscheint nach meinen Analysen zu hoch. Da er aber keine direkte Bestimmung desselben ausführte, sondern ihn bloß aus einem Spaltungsversuche schloß, so ist die Abweichung des von ihm gefundenen Wertes von dem meinigen nicht zu verwundern.

Über die Resultate der erneuten Untersuchung der Uroferrinsäure hoffe ich demnächst berichten zu können. Bei ihrer Darstellung, zu der von 500 l Harn ausgegangen wurde, verfuhr ich nach den Angaben Thieles; nur wurde in den mit Ammonsulfat gesättigten Harn nicht konzentrierte, sondern verdünnte Schwefelsäure gegossen; der die Uroferrinsäure enthaltende Eisenniederschlag wurde mit verdünnter Schwefelsäure in der Kälte gelöst; der Zusatz von Ammoniak zu dieser Lösung

zur Ausfällung des Eisenhydroxyds geschah gleichfalls in der Kälte. Auch die Uroferrinsäure, die ich auf diese Weise erhalten habe, enthält, wie ich qualitativ feststellte, Ätherschwefelsäure.

Zum Schlusse möchte ich die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassen:

1. In den im normalen Menschenharn vorkommenden stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, die unlösliche Mercurisalze, wasserlösliche, alkoholunlösliche Baryumsalze bilden, ist ein Teil des Schwefels in Form von Ätherschwefelsäure enthalten.

2. Die «Alloxyproteinsäure», die Ätherschwefelsäure enthält, ist keine einheitliche Substanz.

3. Aus der mit Ammonsulfat gesättigten Lösung der «Alloxyproteinsäure» läßt sich durch Eisenalaun eine Substanz isolieren, die sich wie Uroferrinsäure verhält, Ätherschwefelsäure, jedoch keinen mit Alkali abspaltbaren Schwefel enthält.

4. Der von Bondzynski und seinen Mitarbeitern als «Urochrom» beschriebene Stoff enthält diesen oder einen anderen Farbstoff nur in geringer Menge, ist aber selbst kein Farbstoff.

5. Der von Thiele für die Uroferrinsäure angegebene Ätherschwefelsäuregehalt wurde durch direkte Bestimmungen, die allerdings bloß mit geringen Substanzmengen ausgeführt wurden, und denen deshalb noch kein endgültiger Wert beizulegen ist, als etwas zu hoch berichtet. Bei einer Neudarstellung der Uroferrinsäure unter Vermeidung der in Thieles Darstellungsmethode von Bondzynski und seinen Mitarbeitern beanstandeten Mängel wurde ein Präparat erhalten, dessen Gehalt an Ätherschwefelsäure qualitativ sicher gestellt wurde.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. M. Siegfried, für das rege Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, sowie seine wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank auszusprechen.