

XIV.

Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie zu Strassburg.

15.

Ueber die Bildung der Hippursäure.

Von

G. Bunge und O. Schmiedeberg.

Die in den Thierkörper aufgenommenen organischen Stoffe unterliegen im Verdauungskanale zum Theil einer Spaltung unter Wasseraufnahme: Fett zerfällt in Glycerin und Fettsäuren, Stärkemehl in Zucker. In diesen Vorgängen liegt für den Chemiker insofern nichts räthselhaftes, als sie auch ausserhalb des Organismus sich künstlich hervorbringen lassen. — Anders verhält es sich dagegen mit gewissen chemischen Vorgängen, welchen die aus dem Verdauungskanale resorbirten Stoffe in den Geweben des Thierkörpers unterliegen. Hier findet der umgekehrte Process statt: es werden die unter Wasseraufnahme gespaltenen Molecüle unter Wasseraustritt wiederum vereinigt.

Derartige, mit mehr oder weniger Sicherheit nachgewiesene Synthesen sind die Vereinigung des Glycerins und der Fettsäuren zu Fetten, die Verwandlung des Zuckers in Glykogen, die Vereinigung von Benzoesäure und Glykokoll zu Hippursäure, von Kohlensäure und Ammoniak zu Harnstoff, von Schwefelsäure und gewissen aromatischen Verbindungen zu gepaarter Schwefelsäure¹⁾ u. s. w.

In welcher Weise und durch welche Mittel diese unter Wasseraustritt verlaufenden synthetischen Processe zu Stande kommen, ist noch völlig räthselhaft, da sie ausserhalb des Organismus nur unter Bedingungen vor sich gehen, die im Organismus niemals realisirt sind.

1) E. Baumann, Ueber gepaarte Schwefelsäuren im Organismus. Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol. 1876. Bd. 13. S. 285.

Wir stellten uns daher bei der vorliegenden Untersuchung die Aufgabe, zunächst an einem Beispiele, an der Bildung der Hippursäure die Verhältnisse und Bedingungen, unter denen eine solche Synthese unter Wasseraustritt im Thierkörper zu Stande kommt, näher zu studiren. Wenn diese Aufgabe durch die vorliegenden Untersuchungen auch noch lange nicht als gelöst zu betrachten ist, so glauben wir doch einige nothwendige Vorarbeiten dazu geliefert zu haben.

I.

Methode zum Nachweise der Hippursäure.

Dass die bisherigen Untersuchungen über die Bildung der Hippursäure im Organismus zu keinem entscheidenden, unzweideutigen Resultate geführt haben, ist hauptsächlich dem Umstande zuzuschreiben, dass die bisherigen Methoden zum Nachweise der Hippursäure in den Geweben und Flüssigkeiten des Thierkörpers noch keine genügend genauen waren. Wir mussten daher vor Allem darauf ausgehen, eine vollkommen zuverlässige Methode zum Nachweise auch der geringsten Hippursäuremenge und zur scharfen Trennung derselben von allen übrigen Bestandtheilen des Thierkörpers ausfindig zu machen. Nach vielfachen Versuchen der verschiedensten Art hat sich uns die folgende Methode als die genaueste und zuverlässigste und für alle physiologischen Zwecke vollkommen genügende herausgestellt.

Die fein zerhackten Organe werden mit lauwarmem Wasser (ca. 40—50 °C.) mehrfach extrahirt und ausgepresst. Heisses Wasser ist zu vermeiden, weil dasselbe leimartige Substanzen aufnimmt, welche bei den späteren Operationen störend sind. Das so erhaltene Wasserextract wird auf dem Dampfbade eingengt und, falls die Reaction alkalisch ist, mit Salzsäure bis zur neutralen oder schwach sauren Reaction versetzt. Sobald das Eiweiss coagulirt ist und den grössten Theil der Fette u. s. w. eingeschlossen hat, wird filtrirt oder durch Leinwand colirt. Eine Zersetzung der Hippursäure beim Erhitzen der schwach sauren oder neutralen Lösung ist, wie wir durch besondere Versuche festgestellt haben, nicht zu befürchten. Dieselbe tritt erst bei Einwirkung concentrirter Säuren ein.

Bei der Untersuchung des Blutes wurde dasselbe mit Wasser (wenigstens dem gleichen Volumen) verdünnt, mit Salzsäure bis zur neutralen („amphoteren“) Reaction versetzt und auf dem Dampfbade oder über freiem Feuer erhitzt, bis das Eiweiss geronnen, die rothe Farbe vollkommen verschwunden war, und ein klares, nahezu farbloses Filtrat erhalten wurde.

Die so gewonnenen, vom grössten Theile der Albuminate befreiten Filtrate werden sofort durch Zusatz einer geringen Menge kohlen sauren Natrons alkalisch gemacht und auf dem Dampfbade zur Syrupconsistenz eingeengt. Der Syrup wird mit einer grossen Menge absoluten Alkohols in einen Ballon gespült, einige Zeit stehen gelassen und filtrirt. Das klare alkoholische Filtrat wird auf dem Dampfbade eingeengt und dabei ab und zu mit kleinen Mengen Wassers versetzt, bis der Alkohol vollständig entwichen ist.

Bei der Untersuchung des **Harnes** wurde derselbe, falls er sauer war, mit etwas kohlen saurem Natron alkalisch gemacht, bis fast zur Trockne eingedampft, mit Alkohol aufgenommen u. s. w.

Die erkaltete wässrige Lösung wird stark mit Salzsäure angesäuert und, falls sie sich dabei trübt, filtrirt. Die abgeschiedenen Flocken enthalten, wie wir durch besondere Untersuchungen festgestellt haben, niemals Hippursäure, da diese Säure sich immer nur sehr langsam ausscheidet. Sie bestehen hauptsächlich aus Fett und enthalten bisweilen auch einen Theil der Benzoesäure, falls diese vor dem Säurezusatz in grösserer Menge in der Lösung enthalten war. Die filtrirte saure Lösung (ca. 15–30 C.-Ctm.) wird in einen kleinen Ballon gebracht und vielfach mit Essigäther ausgeschüttelt, welcher sehr vollständig sämtliche Hippursäure aufnimmt.

Das Filtriren der wässrigen Lösung nach Zusatz der Salzsäure und das Auswaschen des Filters geht bisweilen sehr langsam und schwierig von Statten wegen der Anwesenheit von Fett- und Eiweissstoffen. Häufig gelangt man in solchen Fällen durch Erneuerung des Filters zum Ziele. Bisweilen aber erweist sich auch dieses Mittel als fruchtlos und es bleibt dann nichts anderes übrig, als die nicht filtrirte, trübe Lösung sofort mit Essigäther zu schütteln. Da der Essigäther sich in diesen Fällen meist nicht als klare Schicht über der wässrigen Lösung absetzt, so fügt man so lange Alkohol hinzu, bis man über der wässrigen Lösung eine klare Lösung der Hippursäure nebst anderen Stoffen in Essigäther und Alkohol erhält. Diese Lösung wird abgegossen und derselbe Process noch mehrmals wiederholt. Darauf werden die vereinigten abgegossenen Lösungen mit kohlen saurem Natron übersättigt, eingedampft, mit Wasser aufgenommen, wiederum in einen Ballon gebracht, angesäuert und nun mit reinem Essigäther ausgeschüttelt.

Dass der **Essigäther** die Hippursäure weit leichter und vollständiger aufnimmt als der bei den bisherigen Methoden zum Ausschütteln der Hippursäure angewandte gewöhnliche Aether, geht aus folgenden Versuchen hervor: ein Brei von Hippursäurekrystallen und Wasser wird das eine Mal mit Aether, das andere Mal mit Essigäther anhaltend geschüttelt, die sich oben absetzende klare ätherische Lösung durch ein trockenes Filter in einen Ballon decantirt, gewogen, in einer Schale verdunstet und das Gewicht des Rückstandes bestimmt. Es ergab sich auf diese Weise in einer Reihe von Bestimmungen, dass ein Gewichtstheil Hippursäure

zu seiner Lösung bei 20—25 °C. 200—270 Gewichtstheile mit Wasser gesättigten Aethers und nur 16—22 Gewichtstheile mit Wasser gesättigten Essigäthers bedarf. Das Lösungsvermögen des Essigäthers unter diesen Bedingungen ist also 12 mal grösser als das des Aethers. Weitere Versuche wurden folgendermassen angestellt:

1) 0,2841 Hippursäure werden mit kohlen saurem Natron in 20 C.-Otm. Wasser gelöst, die Lösung wird darauf mit Salzsäure angesäuert und 3 mal mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Der abgegossene Essigäther wird durch Waschen mit etwas Wasser von der aufgenommenen Salzsäure befreit, bei mässiger Temperatur der Verdunstung überlassen und der Rückstand gewogen: er betrug 0,2573 Grm. = 90,6 pCt. der ganzen Menge. Darauf wurde die wässrige Hippursäurelösung noch 2 mal mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Der Rückstand von der so gewonnenen Essigätherlösung wog 0,0193 Grm. = 6,8 pCt. der ganzen Menge.

2) 0,1875 Hippursäure werden mit kohlen saurem Natron in 20 C.-Otm. Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und 3 mal mit einem der wässrigen Lösung gleichen Volumen Aether ausgeschüttelt. Der Rückstand der Aetherlösung wog 0,1047 Grm. = 55,8 pCt. Der nach weiterem zweimaligem Ausschütteln mit Aether erhaltene Rückstand wog 0,0403 Grm. = 21,5 pCt. Darauf wurde die Lösung noch einmal mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt: der Rückstand wog 0,0350 Grm. = 18,7 pCt.

Es wurden also erhalten beim Ausschütteln

mit Essigäther:		mit Aether:
3 mal	90,6 pCt.	55,8 pCt.
weitere 2 mal	6,8 „	21,5 „
	97,4 „	77,3 „

nach weiterem einmaligen Ausschütteln mit Essigäther:

18,7 „
96,0 „

Der Essigäther hat also dem Wasser weit vollständiger die Hippursäure entzogen als der Aether, obgleich die Menge der Hippursäure bei dem Versuche mit Essigäther bedeutend grösser war.

Beim Ausschütteln mit Essigäther wird ausser der Hippursäure auch Benzoesäure nebst der etwa noch vorhandenen geringen Fettmenge aufgenommen. Der abgegossene Essigäther wird mit Wasser gewaschen und in einer Glasschale bei mässiger Temperatur der Verdunstung überlassen. Der so erhaltene Rückstand besteht hauptsächlich aus Hippursäure, Benzoesäure und Fett. Das Fett und die Benzoesäure werden vollständig entfernt durch „Petroleumäther“, welcher diese Stoffe leicht aufnimmt, die Hippursäure aber völlig ungelöst lässt.

Unter dem Namen „Petroleumäther“ kommen die leichter flüchtigen (unter 100 °C. siedenden) Bestandtheile des amerikanischen Steinöls in

den Handel. Dass mit Hilfe dieses Lösungsmittels die Hippursäure von der Benzoësäure sich vollkommen scharf und sicher trennen lässt, ersieht man aus den folgenden Versuchen:

1) 0,3374 Hippursäure und 0,3 Benzoësäure werden gemischt und mit Petroleumäther behandelt. Der ungelöst gebliebene Rückstand wird getrocknet und gewogen: er beträgt 0,3376. Er wird darauf wiederholt mit Wasser auf dem Dampfbade eingedampft, ohne dass der geringste Gewichtsverlust eintritt — ein Beweis, dass er frei von Benzoësäure war. — Der Rückstand der Petroleumätherlösung wird auf Stickstoff geprüft: er erweist sich als vollkommen stickstofffrei, enthält also keine Hippursäure.

2) 0,3517 Hippursäure mit 0,3 Benzoësäure und 0,5 Talg werden mit Petroleumäther behandelt. Der ungelöst bleibende Rückstand wiegt 0,3506 Grm.

Ein weiterer Versuch wurde in der Weise angestellt, dass ein Gemenge von Benzoësäure und Hippursäure in warmem Wasser gelöst und mit Petroleumäther ausgeschüttelt wurde. Der Rückstand von dem abgegossenen Petroleumäther erwies sich als vollkommen stickstofffrei.

Der nach der Behandlung mit Petroleumäther hinterbleibende Rückstand besteht aus Hippursäure nebst einer geringen Menge verunreinigender Substanzen. Derselbe wird in warmem Wasser gelöst, mit ein wenig Thierkohle behandelt und filtrirt. Das Filtrat wird in einer kleinen Glasschale bei mässiger Temperatur (höchstens 50—60 °C.) eingeeengt, bis beim Erkalten die Hippursäure herauszukrystallisiren beginnt.

Ist die Menge der Hippursäure sehr gering, so scheiden sich, selbst wenn die Flüssigkeit auf wenige Tropfen eingeeengt ist, auch nach tagelangem Stehen keine Krystalle aus. Es scheint, dass die Anwesenheit anderer organischer Säuren — bei der Untersuchung gewisser Organe, hauptsächlich Milchsäure — die Ausscheidung sehr kleiner Hippursäuremengen verhindert. In diesen Fällen gelingt es auf folgendem Wege die Hippursäure von der Milchsäure zu trennen:

Die syrupöse Flüssigkeit (meist nur wenige Tropfen) wird mit etwas Wasser verdünnt und mit Zinkoxyd auf dem Dampfbade digerirt. Die gebildete Lösung der Zinksalze wird filtrirt und fast bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Alkohol aufgenommen und filtrirt. Das in Alkohol fast ganz unlösliche Zinksalz der Milchsäure bleibt hierbei zum grössten Theil zurück und das hippursäure Zink geht in Lösung. Die alkoholische Lösung wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand in etwas Wasser gelöst, in einen Ballon gebracht, mit Salzsäure versetzt und mit Essigäther ausgeschüttelt. Der abgegossene Essigäther wird mit Wasser gewaschen und aus dem Rückstande des Essigäthers erhält

man auf Zusatz von ein paar Tropfen warmen Wassers nach einigem Stehen die Hippursäure krystallinisch.

Ein Verkennen der so gewonnenen Hippursäurekrystalle ist schon beim blossen Betrachten unmöglich. Nöthigenfalls gibt der Nachweis des Stickstoffes und das Sublimiren von Benzoesäure beim Erhitzen weitere Sicherheit.

Um uns von der Genauigkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode zu überzeugen und zu zeigen, dass mit Hilfe derselben auch sehr geringe Mengen Hippursäure mit Sicherheit in allen Organen nachweisbar sind und von allen Bestandtheilen des Thierkörpers sich trennen lassen, haben wir folgende Versuche ausgeführt:

10 grosse Frösche werden mit Hilfe einer Hackmaschine fein zerhackt und mit einer Lösung von 0,0245 Hippursäure und 0,2 Benzoesäure in kohlensaurem Natron innig gemischt. Aus dieser Mischung werden nach der obigen Methode 0,0124 Hippursäure in mehrfach ausgewaschenen, fast farblosen Krystallen wiedergewonnen.

Dass nicht mehr Hippursäure wiedergefunden wird, liegt hauptsächlich daran, dass die aus dem Froschbrei erhaltene Essigätherlösung Milchsäure aufgenommen hat, welche, wie bereits erwähnt, nach der Vertreibung des Essigäthers einen Theil der Hippursäure in Lösung hält. Wurde nur 0,01 Grm. Hippursäure zu einem Brei von 10 Fröschen hinzugefügt, so erhielten wir zuletzt als Rückstand aus der Essigätherlösung einige Tropfen eines Syrup, aus dem auch nach mehrtägigem Stehen keine Hippursäure sich ausschied. Bei Anwendung von Zinkoxyd aber nach der obigen Methode liess sich auch eine so geringe Menge Hippursäure mit voller Sicherheit nachweisen:

0,0105 Hippursäure und 0,1 Benzoesäure werden als Natronsalz mit dem Brei von 10 grossen Fröschen gemischt. Die Menge der aus diesem Brei bei Anwendung der Methode mit Zinkoxyd wiedergewonnenen, mehrmals mit Wasser ausgewaschenen Hippursäurekrystalle betrug 0,0045 Grm. — Wie wir durch besondere Versuche festgestellt haben, enthalten die Frösche unter normalen Verhältnissen niemals Hippursäure.

Der Nachweis der Hippursäure im Blute, mit dem wir es bei den folgenden Versuchen hauptsächlich zu thun hatten, ist weit leichter als der im Froschbrei, weil bei der Untersuchung des Blutes der Essigäther nicht soviel von den syrupösen Stoffen aufnimmt, welche die Ausscheidung der Hippursäurekrystalle hindern. Man bedarf beim Nachweise der Hippursäure im Blute meist nicht der Anwendung des Zinkoxyds.

Zum Nachweise der **Benzoesäure** neben der Hippursäure liessen wir die bei der Trennung der beiden Säuren in der beschriebenen Weise erhaltene Petroleumlösung bei mässiger Temperatur, am besten

bei Zimmertemperatur verdunsten. Der Rückstand enthielt die Benzoesäure in krystallinischem Zustande neben Fett. Von letzterem lässt sie sich leicht durch Extraction mit warmem Wasser trennen. Beim Erkalten der filtrirten wässrigen Lösung scheidet sich die Benzoesäure in Krystallen aus. Ist die Menge der Benzoesäure sehr gering, so lässt man die wässrige Lösung über Schwefelsäure einengen, bis die Krystalle sich ausscheiden. An der Form dieser Krystalle, dem Fehlen des Stickstoffes, an der Sublimirbarkeit und dem specifischen Geruche beim Erwärmen ist die Benzoesäure leicht zu erkennen und eine Verwechslung mit anderen Krystallen ganz unmöglich. War in den zu untersuchenden Organen und Flüssigkeiten Benzoesäure in grösserer Menge enthalten, so trat sie, wie bereits erwähnt, schon in dem auf Zusatz von Salzsäure zum Rückstande des Alkoholextractes entstehenden Niederschlage auf.

II.

Ueber den Ort der Hippursäurebildung im Thierkörper.

Um die Verhältnisse und Bedingungen, unter denen die Bildung der Hippursäure im Thierkörper zu Stande kommt, studiren zu können, musste vor Allem die Frage entschieden werden, in welchen Organen dieselbe vor sich geht.

Zur Entscheidung dieser Frage sind bisher zwei Untersuchungen ausgeführt worden, die eine von Kühne und Hallwachs¹⁾, die andere von Meissner und Shepard.²⁾ Kühne und Hallwachs kamen zu dem Resultate, „dass innerhalb der Lebergefässe, also im Blute bei Gegenwart von Gallenbestandtheilen, und zwar durch eine Spaltung der Glykocholsäure aus der Benzoesäure Hippursäure entsteht“ (S. 396). Meissner und Shepard dagegen schliessen aus ihren Versuchen, dass der Ort der Hippursäurebildung die Nieren seien, geben indessen selbst zu, dass die Ergebnisse ihrer Versuche sehr wohl auch in anderem Sinne gedeutet werden können (S. 39). Die Frage nach dem Orte der Hippursäurebildung im Thierkörper war also durch die bisherigen Versuche noch keineswegs entschieden.

Wir beschlossen zunächst die Versuche mit Ausschluss des Leberkreislaufes zu wiederholen.

Versuch I.

Einem kleinen Hunde werden in der Chloroformnarkose sämtliche in der Porta hepatis ein- und austretenden Gefässe

1) Ueber die Entstehung der Hippursäure u. s. w. Virchow's Arch. f. pathol. Anatomie 1857. Bd. 12. S. 386.

2) Untersuchungen üb. d. Entst. d. Hippursäure u. s. w. Hannover 1866.

mit einer gemeinsamen starken Schlinge unterbunden. Darauf werden 1,22 Grm. Benzoesäure als Natronsalz und eine äquivalente Menge (0,75) Glykokoll in eine Schultervene injicirt. Das Thier lebte nach der Injection 55 Minuten. Die Section ergab, dass die Unterbindung der Lebergefässe vollkommen gelungen war. Die Harnblase war contrahirt und leer, die Milz enorm angeschwollen und mit Blut überfüllt. Die grossen Gefässstämme werden aufgeschnitten und mit Hilfe eines reinen Schwammes ca. 100 C.-Ctm. Blut gewonnen. In diesem Blute liess sich mit Sicherheit eine geringe Menge Hippursäure nachweisen.

Versuch II.

Einem Hunde werden in der Chloroformnarkose die Lebergefässe unterbunden und darauf 2,44 Benzoesäure als Natronsalz und 1,50 Glykokoll in die Jugularis injicirt. 50 Minuten darauf wird dem noch lebenden Thiere die Carotis geöffnet, es fliessen aber nur ca. 46 C.-Ctm. Blut heraus. — Sectionsbefund wie beim vorigen Versuche. — Unterbindung vollkommen gelungen. — Durch Aufschneiden der grossen Gefässstämme und Aufsaugen mit einem Schwamme werden noch ca. 200 Grm. Blut gewonnen. In den vereinigten Blutportionen liess sich nicht mit Sicherheit Hippursäure nachweisen.

Die Ergebnisse dieser zwei Versuche stimmen vollkommen mit denen der entsprechenden Versuche von Meissner und Shepard (a. a. O. S. 46—50) überein. Wir wurden durch dieselben zu der Ueberzeugung geführt, dass die Frage nach der Bedeutung der Leber bei der Hippursäurebildung sich durch Versuche an Säugethieren nicht entscheiden lasse, weil bei diesen Thieren nach Aufhebung des Leberkreislaufes in Folge der Stauung im Pfortadersysteme in gewissen Organen die Circulation fast völlig sistirt wird. Die folgenden Versuche wurden daher an Fröschen ausgeführt, welche nach vollständiger Exstirpation der Leber noch 2—3 Tage am Leben bleiben. Nur wenn den entlebten Fröschen grössere Mengen (mehr als 0,03 Grm.) Benzoesäure und Glykokoll injicirt werden, sterben die Thiere rasch.

Versuch III.

Dieser Versuch sollte dazu dienen, zunächst festzustellen, dass im Organismus der Frösche überhaupt Hippursäure gebildet wird. Einem Frosche werden 0,09 Benzoesäure als Natronsalz und 0,06 Glykokoll in 3 C.-Ctm. Lösung in den Rückenlymphsack injicirt. Ein zweiter Frosch erhält 0,06 Benzoesäure

und 0,04 Glykokoll, ein dritter 0,05 Benzoessäure und 0,03 Glykokoll. Nach 15 Stunden werden alle drei mit Aether getötet, fein zerhackt und auf Hippursäure untersucht. Das Glasgefäß, in welchem sich die Frösche während der Versuchszeit aufgehalten haben, wird ausgespült und die Flüssigkeit — bei diesen wie bei allen folgenden Versuchen — mit dem zu untersuchenden Froschbrei vereinigt. Es liess sich mit voller Sicherheit Hippursäure nachweisen in wohlausgebildeten makroskopischen Krystallen.

Versuch IV.

Eine Lösung von 0,52 Benzoessäure als Natronsalz ohne Glykokoll wird 10 Fröschen in die Rückenlymphsäcke injicirt. Nach 40 Stunden wurden die Thiere mit Aether getötet, fein zerhackt u. s. w. — Es liess sich Hippursäure nachweisen.

Ohne vorhergegangene Injection von Benzoessäure haben wir im Organismus der Frösche niemals Hippursäure nachweisen können, obgleich wir 5 mal den Brei von je 10 Fröschen auf Hippursäure geprüft haben.

Versuch V.

9 Fröschen wird durch einen Schnitt rechts von der Linea alba die Bauchhöhle geöffnet: die Leber wird herausgezogen, abgebunden und vollständig extirpirt. Die Bauchwunde wird sofort sorgfältig durch Näthe geschlossen. An den Thieren ist nach dieser Operation äusserlich keine wesentliche Störung wahrnehmbar: sie springen mit fast ungeschwächter Kraft umher oder sitzen in der gewohnten, normalen Stellung. Gleich nach der Operation wird den 9 Fröschen zusammen eine Lösung von 0,46 Benzoessäure als Natronsalz und 0,30 Glykokoll in die Rückenlymphsäcke injicirt. Einer starb bereits nach 2 Stunden; nach 6 Stunden waren weitere 3 todt, nach 20 Stunden war nur noch einer am Leben. Darauf wurden alle 9 zerhackt u. s. w. Es liess sich eine bedeutende Menge Hippursäure in schönen, wohlausgebildeten Krystallen darstellen.

Es folgt aus diesem Versuche, dass die Leber nicht der Ort, jedenfalls nicht der ausschliessliche Ort der Hippursäurebildung ist. Indessen haben auch Kühne und Shepard die Leber nur insofern als den Ort der Hippursäurebildung bezeichnet, als sie das Glykokoll zur Hippursäurebildung liefere. Um die Richtigkeit dieser Ansicht zu prüfen, injicirten wir bei dem folgenden Versuche den entlebten Fröschen nur Benzoessäure und kein Glykokoll.

Versuch VI.

9 Fröschen wird die Leber extirpirt und allen zusammen eine Lösung von 0,5 Benzoessäure als Natronsalz **ohne** Glykokoll in die Rückenlymphsäcke injicirt. Nach 20 Stunden waren noch 8 am Leben, nach 24 Stunden 6. Darauf die letzteren mit Aether getödtet, alle 9 zerhackt u. s. w. Es liess sich Hippursäure in wohlausgebildeten Krystallen darstellen; die Menge derselben aber war weit geringer als bei dem vorigen Versuche. Wägungen wurden nicht ausgeführt; nach einer annähernden Schätzung aber betrug die Menge der beim vorigen Versuche erhaltenen Krystalle wenigstens das 5fache der bei diesem Versuche ohne Glykokoll gewonnenen.

Die entlebten Frösche sind also im Stande, auch ohne gleichzeitige Zufuhr von Glykokoll Benzoessäure in Hippursäure umzuwandeln. Es bleibt indessen die Möglichkeit offen, dass die geringe in der Hippursäure ausgeschiedene Glykokollmenge dennoch aus der Leber stammte: es war möglicher Weise nach Exstirpation der Leber das von derselben gebildete Glykokoll noch nicht vollständig aus dem Organismus verschwunden, bevor die Benzoessäure injicirt wurde. Bei dem folgenden Versuche liessen wir daher eine längere Zeit zwischen der Leberexstirpation und der Benzoessäureinjection verfliessen.

Versuch VII.

11 Frösche entlebert, nach 20 Stunden alle noch am Leben. Sie werden mit Wasser abgespült und darauf jedem 0,01 Benzoessäure als Natronsalz in 0,5 C.-Ctm. Lösung in den Rückenlymphsack injicirt. Nach 10 Stunden noch alle 11 am Leben, nach 28 Stunden noch 8. Darauf alle 11 zerhackt u. s. w. Es liess sich Hippursäure darstellen: Das Gewicht der mehrmals ausgewaschenen, über Schwefelsäure getrockneten Krystalle betrug 0,014 Grm.

Ein Versuch, die entlebten Frösche vor der Injection noch längere Zeit leben zu lassen, konnte nicht durchgeführt werden: nach 2 mal 24 Stunden waren von 12 Fröschen bereits die Hälfte todt, die übrigen matt — nach 3 mal 24 Stunden waren alle todt.

Jedenfalls kann man schon aus dem Versuche VII mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass auch das Glykokoll zur Hippursäurebildung nicht von der Leber geliefert wird.

Versuch VIII.

14 männlichen Fröschen werden beide Nieren sammt den Hoden nach vorhergegangener Unterbindung der grösseren ein-

und austretenden Gefässe vollständig extirpirt und die Bauchwunde wird sorgfältig durch Näthe geschlossen. Darauf wird allen zusammen eine Lösung von 0,12 Benzoessäure als Natronsalz und 0,08 Glykokoll in die Rückenlymphsäcke injicirt. Nach 24 Stunden 11 noch am Leben. Es wurden alle 14 zerhackt u. s. w. Es liess sich Hippursäure darstellen: die mehrfach abgespülten und über Schwefelsäure getrockneten, wohlausgebildeten, makroskopischen Krystalle wogen 0,0252 Grm. Aus der Mutterlauge schieden sich weitere Krystalle aus.

Im Organismus der Frösche ist also auch die Niere nicht der ausschliessliche Ort der Hippursäurebildung.

Die folgenden Versuche wurden wiederum an Hunden ausgeführt.

Versuch IX.

Einem kleinen Hunde (ca. 4 Kgrm.) wird in der Chloroformnarkose durch einen Schnitt in der Linea alba die Bauchhöhle geöffnet und an beiden Nieren werden die Gefässe unterbunden; die Bauchwunde wird vernäht und 1,22 Benzoessäure als Natronsalz nebst 0,75 Glykokoll in die Jugularis injicirt. 1¼ Stunde nach der Injection wird der Hund, an welchem äusserlich keine tiefer greifenden Störungen des Befindens wahrnehmbar sind, durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Es wurden 270 Grm. Blut gewonnen. Die Section ergab, dass die Unterbindung vollkommen gelungen war. Im Blute liess sich viel Benzoessäure aber keine Spur von Hippursäure nachweisen.

Versuch X.

Einem mittelgrossen Hunde (ca. 8 Kgrm.) werden in der Chloroformnarkose an beiden Nieren die Gefässe unterbunden. Das Eindringen in die Bauchhöhle geschah in der gewöhnlichen Weise von der Lendengegend aus mit Schonung des Peritonäums. Darauf werden 2,44 Benzoessäure als Natronsalz und 1,5 Glykokoll in die Jugularis injicirt. 2½ Stunde nach der Injection wird das Thier durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Es werden 550 Grm. Blut gewonnen. Die Section ergibt, dass die Unterbindung vollkommen gelungen war. Ausser dem Blute wird noch die Leber und der grössere Theil der Muskeln (ca. ⅔ der gesammten Musculatur aus allen Körpertheilen) auf Hippursäure untersucht. Es liess sich weder im Blute, noch in der Leber, noch in den Muskeln auch nur eine Spur Hippursäure nachweisen, wohl aber in allen Benzoessäure.

Versuch XI.

Einem mittelgrossen Hunde werden in der Chloroformnarkose beide Ureteren, jede durch zwei Schlingen unterbunden. Darauf wurden 2 Grm. Benzoesäure als Natronsalz und 3 Grm. Glykokoll in die Jugularis injicirt. 2½ Stunde darauf wird das Thier durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Die Section ergibt, dass die Unterbindung vollkommen gelungen war. Das Blut und die Nieren werden getrennt auf Hippursäure untersucht. In beiden lässt sich in ansehnlicher Menge Hippursäure neben Benzoesäure nachweisen.

Versuch XII.

Einem grossen Hunde werden 3,74 Benzoesäure als Natronsalz und 2,30 Glykokoll in die Jugularis injicirt. ½ Stunde darauf wird das Thier durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Der während dieser Operation entleerte Harn wird aufgefangen. Im Blute (790 Grm.) liess sich neben Benzoesäure nur eine sehr geringe Menge Hippursäure nachweisen, im Harne reichlich Hippursäure und keine Benzoesäure.

Es folgt aus diesen Versuchen, dass der Ort der Hippursäurebildung im Organismus des Hundes die Niere ist.

Falls ausser den Nieren noch andere Organe Hippursäure bilden sollten, so könnten es nur noch die Schweissdrüsen sein, welche ihr Secret nach aussen befördern, so dass die in ihnen gebildete Hippursäure nach Unterbindung der Niere im Organismus nicht zurückgehalten wird. Es ist diese Vermuthung insofern nicht unwahrscheinlich, als die Schweissdrüsen ja überhaupt eine gewisse Analogie mit den Nieren aufweisen und vicariirend für die Nieren fungiren zu können scheinen. Ob thatsächlich im Schweisse Hippursäure ausgeschieden wird, bleibt noch unentschieden. Schottin¹⁾ und Meissner und Shepard²⁾ konnten nach Aufnahme von Benzoesäure keine Hippursäure im Schweisse nachweisen. H. Meissner³⁾ dagegen gibt an, Hippursäure im Schweisse gefunden zu haben. Sollte die Angabe dieses letzteren Forschers sich bestätigen, so würde damit die Vermuthung nahe gelegt, dass auch beim Frosche, welcher thatsächlich, wie Versuch VIII lehrt, auch ohne Nieren Hippursäure bildet, diese Bildung in den Hautdrüsen vor sich geht. Die Richtigkeit dieser Vermuthungen zu prüfen müssen wir weiteren Forschungen überlassen.

Zur Bestätigung der Angaben von Meissner und Shepard,

1) Ueb. d. chem. Bestandth. d. Schweisses. Vierordt's Arch. f. phys. Heilk. 1852. Jahrg. 11. S. 97—99.

2) a. a. O. S. 28 ff.

3) De sudoris secretione. Dissert. Leipzig 1859.

dass das normale Blut niemals Hippursäure enthält (a. a. O. S. 9—19), theilen wir noch mit, dass auch wir im normalen Rindsblute, von welchem wir 2 Liter in Arbeit nahmen, keine Spur von Hippursäure haben nachweisen können.

III.

Ueber die Bedingungen der Hippursäurebildung in der Niere.

Die Verhältnisse und Bedingungen, unter denen die Bildung der Hippursäure in den Nieren zu Stande kommt, mit Erfolg studiren zu können, durften wir nur dann hoffen, wenn es gelänge, auch in der isolirten, **ausgeschnittenen Niere** diese Bildung vor sich gehen zu lassen. Wir stellten daher die folgenden Versuche an.

Versuch XIII.

Ein Hund (ca. 10 Kgrm.) wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Das defibrirte und colirte Blut wird mit 0,5 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt. Eine Niere wird herausgeschnitten und es werden in die Arterie, in die Vene und in den Ureter Glascanülen eingebunden. Das Blut wird in einen mit einer Ausflussröhre versehenen Glasballon gegossen, der Ballon 1,75 Meter hoch über der Niere befestigt und durch einen Kautschukschlauch mit der Canüle der Nierenarterie in Verbindung gesetzt. Die Menge des aus der Vene fließenden Blutes betrug anfangs 600, zuletzt 100 C.-Ctm. in der Stunde. Das ausgeflossene Blut wurde nach abermaligem Coliren wieder in den Glasballon zurückgegossen. Das Durchleiten begann $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Verbluten des Thieres und wurde 8 Stunden lang fortgesetzt. Aus dem Ureter flossen während dieser Zeit ca. 30 C.-Ctm. einer klaren, alkalisch reagirenden Flüssigkeit, welche in den ersten 5 Stunden nur schwach gelblich gefärbt war, zuletzt aber eine röthliche Färbung (Hämoglobin) annahm. Sie enthielt etwas Eiweiss. Sowohl das Blut als auch die Niere und die Flüssigkeit aus dem Ureter wurden jedes für sich auf Hippursäure untersucht. Es liess sich in allen dreien mit voller Sicherheit Hippursäure neben Benzoesäure nachweisen, besonders reichlich im Blute. — In der anderen Niere liess sich keine Spur von Hippursäure nachweisen.

Da also die Nieren keine Hippursäure enthielten und das normale Blut niemals welche enthält, so konnte die bei dem Durch-

leitungsversuche gefundene Hippursäure nur während des Durchleitens durch die ausgeschnittene Niere gebildet worden sein.

Zu den weiteren Durchleitungsversuchen diente der folgende Apparat: Das Reservoir für das durchzuleitende Blut bildete ein Glasballon, welcher ca. 1 Liter Blut aufnahm, oben tubulirt war und unten in eine mit einem Glashahn versehene Röhre auslief. Den Druck für die Durchleitung des Blutes lieferte die Wasserleitung: Das Wasser floss in einen gewöhnlichen Gasometer und comprimirt in demselben die Luft; der Druck dieser comprimirt Luft wurde auf das Blut in dem Reservoir übertragen, indem der Luftraum in dem Gasometer mit dem über dem Blute in dem Reservoir befindlichen Luftraume communicirte. Durch den Hahn der Wasserleitung konnte der Druck bequem und genau regulirt werden. Das Blutreservoir befand sich in einer Blechwanne, welche mit Wasser von Körpertemperatur gefüllt war und auf dieser Temperatur durch eine darunter gestellte Gasflamme erhalten wurde. Die aus dem Reservoir austretende Glasröhre war mit der Glascanüle der Nierenarterie in Verbindung gesetzt. Unmittelbar vor dem Eintritte in die Niere communicirte die Röhre mit einem seitlich angebrachten Quecksilbermanometer. Um etwaige Luftblasen aus dem Blute zu entfernen, waren in die Verbindungsröhre zwischen dem Blutreservoir und der Niere zwei T-Röhren eingeschaltet, an denen der eine Schenkel senkrecht nach oben gerichtet und durch ein Stück Kautschukschlauch und eine Klemmschraube geschlossen war. In diesem Schenkel sammelten sich alle mitgerissenen Luftbläschen und konnten nöthigen Falls durch vorsichtiges Oeffnen der Klemmschraube fortgeschafft werden.

Die Nieren wurden bei allen Versuchen mit der Fettkapsel zusammen ausgeschnitten. Niemals liess es sich vollständig vermeiden, dass eine geringe Menge Blut auch auf anderem Wege als durch die grosse Vene die Kapsel durchdrang. Soweit als möglich wurden solche Blutungen durch sorgfältige Unterbindungen gestillt.

Das aus der Vene fliessende Blut war stets dunkelvenös gefärbt. Vor dem Zurückgiessen in das Reservoir wurde dasselbe stets so lange mit atmosphärischer Luft geschüttelt, bis es wieder die hellrothe arterielle Färbung angenommen hatte, und darauf durch Leinwand colirt.

Versuch XIV.

Ein grosser Hund wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Es werden 1500 C.-Ctm. Blut erhalten, defibrinirt, colirt und mit 0,7 Grm. Benzoesäure als Natronsalz nebst einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt. Beide Nieren werden ausgeschnitten und das Blut 3 Stunden lang durch beide hindurchgeleitet. Der am Manometer abgelesene Druck betrug höchstens 120 Mm. Hg, die Menge des aus beiden Venen ausströmenden Blutes bis 8 Liter in der Stunde. Das Durchleiten begann $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Verbluten des Thieres und dauerte im Ganzen 3 Stunden. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunden wurde das Blut mit 150 C.-Ctm.

2procentiger Kochsalzlösung verdünnt. Zuletzt wurden der ganze Apparat und die Niere mit Kochsalzlösung ausgespült. Aus den Ureteren floss während dieses Versuches keine Flüssigkeit. In der ganzen mit der durchgeleiteten Kochsalzlösung vereinigten Blutmenge liess sich neben Benzoesäure Hippursäure nachweisen: die mehrfach umkrystallisirten, fast völlig farblosen, trocknen Krystalle wogen 0,095 Grm. Man kann annehmen, dass mindestens 0,15 Grm. gebildet waren.

Versuch XV.

Ein grosser Hund wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Die Menge des defibrinirten und colirten Blutes beträgt 1950 C.-Ctm. $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Verbluten beginnt das Durchleiten des reinen Blutes durch die eine ausgeschnittene Niere. Die ersten aus der Vene fliessenden 100 C.-Ctm. Blut werden besonders aufgefangen und mit der anderen Niere zusammen auf Hippursäure untersucht. Das übrige Blut wird darauf mit 1,5 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und 2 Stunden durchgeleitet. Darauf wird das Blut mit noch 1 Grm. Benzoesäure und 1 Grm. Glykokoll versetzt und weitere $4\frac{1}{2}$ Stunden durchgeleitet, im Ganzen also $6\frac{1}{2}$ Stunden. Die Menge des durchfliessenden Blutes betrug ca. 5 Liter in der Stunde, im Ganzen also über 30 Liter. Der Druck wurde nie höher gesteigert als auf 100 Mm. Hg; bei 40 Mm. floss meist schon ein continuirlicher Strahl aus der Vene. Aus dem Ureter flossen während des ganzen Versuches nur wenige Tropfen einer Serum-ähnlichen Flüssigkeit. Eine geringe Menge Blut floss aus den kleinen Gefässen der Nierenkapsel und wurde mit dem aus der Vene geflossenen zusammen auf Hippursäure untersucht, ebenso die geringe Menge Flüssigkeit aus dem Ureter und die Niere selbst. Es wurde neben Benzoesäure eine bedeutende Menge Hippursäure gefunden: Die umkrystallisirten, trockenen Hippursäurekrystalle wogen 0,535 Grm.

In den zuerst ausgeflossenen, nicht mit Benzoesäure versetzten 100 C.-Ctm. Blut nebst der anderen Niere liess sich dagegen keine Spur von Hippursäure nachweisen: Der Rückstand des Essigäthers bestand aus einem kleinen Tropfen einer syrupösen Flüssigkeit, aus der sich nach tagelangem Stehen eine geringe Menge mikroskopischer Krystalle ausschied, Garben sehr feiner Nadeln, die nach ihren Löslichkeitsverhältnissen nicht für Hippursäure gehalten werden konnten. Sie waren unlöslich in Essigäther, sehr leicht löslich in kaltem Wasser.

Die 3 Versuche lehren also übereinstimmend und unzweifelhaft, dass beim Durchleiten von Benzoesäure-Glykokollhaltigem Blute durch die Niere Hippursäure gebildet wird.

Wir stellten aus der bei diesen Durchleitungsversuchen erhaltenen Hippursäure das Silbersalz dar; es krystallisirte in langen, feinen, seidenglänzenden Nadeln. 0,1414 des über Schwefelsäure getrockneten Salzes gaben 0,0531 Ag = 37,55 pCt. Die Formel $C_9H_8AgNO_3$ fordert 37,76 pCt.

Unentschieden durch die bisherigen Versuche bleibt die Frage, ob auch das dem Blute zugefügte Glykokoll an der Bildung der Hippursäure sich betheiligte oder ob das Glykokoll der Hippursäure aus irgend welchen Bestandtheilen des Blutes oder der Nieren sich abspaltet und im Status nascens mit der Benzoesäure vereinigt.

Für eine directe Vereinigung des in den Organismus eingeführten Glykokolls mit der Benzoesäure spricht ein in Nencki's Laboratorium von Spengel¹⁾ ausgeführter Versuch: Spengel gab einem Hunde (15 Kgrm.) zu seinem Futter 3 Grm. Benzoesäure und fand in dem darauf ausgeschiedenen Harn Benzoesäure und Hippursäure in nahezu gleicher Menge. Einige Tage darauf erhielt derselbe Hund 3 Grm. Natron benzoicum und schied darnach mehr Benzoesäure als Hippursäure im Harne aus. Dasselbe Resultat ergab eine nochmalige Wiederholung dieses Versuches. Als nun aber derselbe Hund 5 Grm. Benzoesäure und 5 Grm. Glykokoll erhielt, wurde im Harne nur Hippursäure und keine Spur von Benzoesäure gefunden, ebenso in einem zweiten Versuche, wo der Hund 5 Grm. Natron benzoicum und 5 Grm. Glykokoll erhielt. Mit diesem Resultate Spengel's steht der von uns mitgetheilte Versuch XII im besten Einklange. Der folgende Versuch dagegen ergab ein entgegengesetztes Resultat.

Versuch XVI.

Einem kleinen Hunde (ca. 4 Kgrm.) wird 1 Grm. Benzoesäure als Natronsalz in die Jugularis injicirt. Nach 3½ Stunden wird der Harn mit dem Katheter entleert. Der Harn enthält 0,141 Benzoesäure und 0,201 Hippursäure, entsprechend 0,137 Benzoesäure. Nach 3 Tagen wurde demselben Hunde wiederum 1 Grm. Benzoesäure als Natronsalz in die Jugularis injicirt, aber zugleich mit 1,5 Grm. (mehr als 2 Aequivalenten) Glykokoll.

1) Ueb. d. chem. Vorgang bei d. Bildung d. Hippursäure. Bern 1875.

Der nach 3½ Stunden mit dem Katheter entleerte Harn enthielt 0,259 Benzoessäure und 0,339 Hippursäure, entsprechend 0,231 Benzoessäure.

Es war also in beiden Fällen nur die Hälfte der ausgeschiedenen Benzoessäure als Hippursäure ausgeschieden worden. Ein Einfluss des eingeführten Glykokolls auf die Umwandlung der Benzoessäure in Hippursäure ist in diesem Versuche nicht nachweisbar.

Es schien uns daher, dass auch die Frage nach der Betheiligung des in den Organismus eingeführten Glykokolls an der Bildung der Hippursäure am sichersten durch Versuche an der ausgeschnittenen Niere sich müsse entscheiden lassen. Wir stellten daher den folgenden Versuch an.

Versuch XVII.

Ein grosser Hund wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Die Menge des defibrinirten und colirten Blutes beträgt 930 C.-Ctm. Das Durchleiten durch eine ausgeschnittene Niere beginnt ½ Stunde nach dem Verbluten des Thieres. Die aus der Nierenvene zuerst ausfliessenden 100 C.-Ctm. Blut werden mit der anderen Niere zusammen auf Hippursäure untersucht. Das übrige Blut wird mit einer Lösung von 0,4 Benzoessäure als Natronsalz ohne Glykokoll versetzt und 3½ Stunden durch die Niere geleitet. Während dieser Zeit floss die ganze Blutmenge 8 mal durch die Niere. Aus dem Ureter flossen nur einige Tropfen einer Serum-artigen Flüssigkeit. Diese wurde nicht untersucht. Durch die Nierenkapsel drang bei diesem Versuche nur wenig Blut. Dieses wurde mit dem aus der Vene geflossenen zusammen untersucht. Es liess sich neben Benzoessäure nur sehr wenig Hippursäure nachweisen: der Tropfen syrupöser Flüssigkeit, aus dem sich die Hippursäurekrystalle ausschieden, wurde mit den Krystallen zusammen über Schwefelsäure eingetrocknet und gewogen. Das Gewicht betrug 0,0296 Grm. Darauf wurden die Krystalle mit einigen Tropfen kalten Wassers abgespült, abermals getrocknet und gewogen. Ihr Gewicht betrug nun 0,0105 Grm.

In den zuerst durchgeleiteten 100 C.-Ctm. Blut und der anderen Niere liess sich keine Spur von Hippursäure nachweisen: aus dem zuletzt erhaltenen Tropfen syrupöser Flüssigkeit schied sich nach mehrtägigem Stehen nur eine geringe Menge derselben mikroskopischen, garbenförmig geordneten feinen Nadeln aus, die wir bereits im Versuche XV bei der Untersuchung der Niere, niemals aber in anderen Organen oder im Blute gefunden haben.

Man sieht also aus diesem Versuche, dass die Niere beim Durchleiten von Benzoesäure-haltigem Blute Hippursäure bildet, auch wenn kein Glykokoll dem Blute beigemischt wurde. Die Menge der gebildeten Hippursäure ist aber weit geringer als bei gleichzeitiger Zufuhr von Glykokoll. Somit scheint der Schluss gerechtfertigt, dass in den Versuchen XIII, XIV und XV das dem Blute zugefügte Glykokoll sich in der Niere mit der Benzoesäure unter Wasseraustritt zur Hippursäure vereinigt hat.

Für eine Bethheiligung des in den Organismus eingeführten Glykokolls an der Hippursäurebildung sprechen ferner auch die Resultate der oben mitgetheilten Froschversuche V und VI.

Durch die folgenden Versuche sollte die Frage entschieden werden, **wie lange Zeit nach dem Tode** der Thiere die Nieren die Fähigkeit bewahren, Benzoesäure in Hippursäure umzuwandeln.

Versuch XVIII.

Ein Hund wird durch Verbluten aus der Carotis und durch Compression der Trachea getödtet. 5 $\frac{1}{2}$ Stunden nach dem Tode werden die Nieren herausgeschnitten, die aus der Carotis erhaltenen 900 C.-Ctm. Blut werden mit 0,5 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und 1 $\frac{1}{2}$ Stunde lang durch beide Nieren geleitet. Darauf wird das Blut durch Zusatz von 90 C.-Ctm. 2procentiger Kochsalzlösung verdünnt und weitere 1 $\frac{1}{2}$ Stunde durchgeleitet. — Druck bis 120 Mm. Hg. — Ausflussgeschwindigkeit bis 6 Liter in der Stunde. — Aus den Ureteren floss keine Flüssigkeit. — Es liess sich im durchgeleiteten Blute mit voller Sicherheit Hippursäure nachweisen. Die Menge derselben schätzten wir auf ca. 0,05 Grm.

Versuch XIX.

Eine ausgeschnittene Hundeniere hat 2 mal 24 Stunden in einem Eisschranke gelegen. Das durchzuleitende Blut ist von einem anderen Hunde gewonnen und hat 24 Stunden in einem Eisschranke gestanden. Das Blut (350 C.-Ctm.) wird mit 0,3 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und 3 Stunden lang durchgeleitet. Das Durchleiten geht sehr langsam vor sich, so dass in der Zeit von 3 Stunden die 350 C.-Ctm. Blut nur 3 mal durch die Niere

hindurchfliessen. Darauf wird das Blut mit 200 C.-Ctm. 2procentiger Kochsalzlösung verdünnt und weitere 1½ Stunden durchgeleitet. In dieser Zeit floss die ganze Blutmenge noch 3 mal durch die Niere. Aus dem Ureter flossen ca. 50 C.-Ctm. einer Serum-artigen Flüssigkeit. Diese wird mit dem durchgeleiteten Blute zusammen untersucht. Die Menge der gefundenen, gereinigten und getrockneten Hippursäurekrystalle wog 0,026 Grm.

Die Nieren bewahren also noch 2 mal 24 Stunden nach der Lostrennung vom Organismus die Fähigkeit Benzoessäure in Hippursäure umzuwandeln.

Wir mussten uns nun die Frage stellen, ob bei der Bildung der Hippursäure das intacte Gewebe der Niere eine Rolle spielt oder ob sich die Niere an diesem Prozesse blos durch die Einwirkung gewisser chemischer Bestandtheile betheiligt, die vielleicht auch im isolirten Zustande diese Wirkung beibehalten. Wir stellten daher folgende Versuche an.

Versuch XX.

3 frische Kalbsnieren werden fein zerhackt, darauf in einem Serpentinmörser mit einem Holzstempel aufs feinste zerstampft, mit 0,2 Benzoessäure und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Es konnte keine Spur von Hippursäure in diesem Nierenbrei nachgewiesen werden.

Versuch XXI.

Blut und Nieren von einem Kalbe werden noch warm aus dem Schlachthause ins Laboratorium gebracht. Die Nieren werden sofort fein zerschnitten und zerstampft, mit 400 C.-Ctm. Blut nebst einer Lösung (3 C.-Ctm.) von 0,3 Benzoessäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll gemischt und unter häufigem Durchschütteln 24 Stunden stehen gelassen. Es liess sich keine Spur von Hippursäure in dem Gemische nachweisen.

Es wurde ferner noch versucht, in dem Brei von zerhackten Fröschen nach Zusatz von Benzoessäure und Glykokoll Hippursäure nachzuweisen. Die Versuche wurden in verschiedener Weise — mit freier Benzoessäure und an Natron gebundener Benzoessäure, Schütteln mit Kohlensäure und atmosphärischer Luft — ausgeführt. In keinem dieser Versuche aber liess sich auch nur eine Spur von Hippursäure nachweisen.

Durch die folgenden Versuche sollte die Frage entschieden werden, ob bei der Bildung der Hippursäure die Blut-

körperchen eine Rolle spielen. Ein Durchleitungsversuch mit reinem Serum musste die Frage entscheiden. Da aber reines Hundebutserum in grösserer Menge schwer zu beschaffen ist, so stellten wir die ersten Versuche mit Kochsalzlösung an.

Versuch XXII.

Ein mittelgrosser Hund durch Verbluten getötet. Eine halbe Stunde darauf beginnt das Durchleiten einer 2procentigen Kochsalzlösung durch beide ausgeschnittene Nieren. Es wird anfangs reine Kochsalzlösung durchgeleitet, bis die aus der Vene ausfliessende Flüssigkeit fast farblos ist. Darauf werden 2 Liter Kochsalzlösung mit 1 Grm. Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll durchgeleitet. Das Durchleiten dauert $3\frac{1}{2}$ Stunden. Die Durchströmungsgeschwindigkeit war eine sehr geringe; es flossen in der ganzen Zeit nur 3 Liter durch beide Nieren. Eine bedeutende Menge Kochsalzlösung durchdrang die Nierenkapsel. Diese wurde mit der aus der Vene ausgeflossenen zusammen untersucht. Aus den Ureteren flossen ca. 70 C.-Ctm. Flüssigkeit. Die zuerst ausgeflossenen 30—40 C.-Ctm. wurden für sich untersucht: es liess sich keine Hippursäure darin nachweisen. Die übrige aus den Ureteren geflossene Flüssigkeit wurde mit der aus den Venen ausgeflossenen vereinigt. In den vereinigten Flüssigkeiten liess sich eine sehr geringe Menge Hippursäure nachweisen.

Versuch XXIII.

Durch die eine ausgeschnittene Niere eines mittelgrossen Hundes wird $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Verbluten des Thieres so lange 2procentige Kochsalzlösung geleitet, bis die aus der Vene fliessende Flüssigkeit farblos und klar ist. — Darauf 1 Liter 2procentiger Kochsalzlösung mit 0,5 Benzoesäure und einer äquivalenten Menge Glykokoll 3 Stunden lang durchgeleitet. Das Durchfliessen ging anfangs rasch, dann aber immer langsamer vor sich: die aus der Vene fliessende Flüssigkeitsmenge wurde immer geringer und die auf anderem Wege die Nierenkapsel durchdringende immer grösser — nach 3 Stunden floss nichts mehr aus der Vene. Aus dem Ureter floss anfangs, während des Durchleitens der reinen Kochsalzlösung eine klare Flüssigkeit in rasch aufeinander folgenden Tropfen. Diese Flüssigkeit wurde nicht untersucht. Während des Durchleitens der Benzoesäure-haltigen Kochsalzlösung floss nichts mehr aus dem Ureter. Die aus der Vene geflossene und die durch die Kapsel gedrungene Flüssigkeit wurden zusammen untersucht.

Es liess sich nur eine sehr geringe Menge Hippursäure neben der Benzoesäure nachweisen. Die bei diesem und dem vorigen Versuche erhaltenen Hippursäurekrystalle wurden zusammen sammt der Mutterlauge, aus der sie sich ausgeschieden hatten, über Schwefelsäure getrocknet und gewogen: ihr Gewicht betrug 0,0350 Grm. Darauf wurden die Krystalle mit ein paar Tropfen kalten Wassers abgespült, wiederum getrocknet und gewogen: ihr Gewicht betrug nun 0,0116 Grm.

Versuch XXIV.

Circa 250 C.-Ctm. durch Centrifugiren von den Blutkörperchen befreiten Hundeblytserums werden mit dem annähernd gleichen Volumen 2procentiger Kochsalzlösung gemischt und durch eine ausgeschnittene Niere von einem anderen Hunde geleitet. Das Durchleiten begann $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Tode des Hundes, dem die Niere entnommen wurde, und 24 Stunden nach der am anderen Hunde vorgenommenen Blutentziehung. — Sobald die aus der Nierenvene ausfliessende Serum-Kochsalzlösung keine rothe Färbung mehr zeigte, wurde die übrige Lösung mit 0,4 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und diese Flüssigkeit 4 Stunden lang durch die Niere geleitet. Das Durchleiten ging rasch vor sich: bei 120 Mm. Hg floss aus der Vene ein continuirlicher Strahl. Durch die Nierenkapsel drang nur wenig Flüssigkeit — während des ganzen Versuches nur ca. 100 C.-Ctm. Diese wurden mit der aus der Vene geflossenen Flüssigkeit zusammen untersucht. Die Blutkörper-haltige Flüssigkeit, welche zum Ausspülen der Nierengefässe gedient hatte, wurde selbstverständlicher Weise nicht mituntersucht. In der durchgeleiteten Serum-Kochsalzlösung wurde nur eine eben nachweisbare Spur Hippursäure gefunden: wir erhielten einen Tropfen einer syrupsösen Flüssigkeit, aus der nach mehrtägigem Stehen eine unwägbare Menge Hippursäure sich ausschied.

Versuch XXV.

Ein kleiner Hund (ca. 5 Kgrm.) durch Verbluten getödtet — beide Nieren herausgeschnitten — Rindsblytserum durch Centrifugiren von den Körperchen befreit und durch beide Nieren geleitet, bis aus der Vene reines Serum floss — darauf 2 Liter Serum mit 1 Grm. Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und 3 Stunden lang durchgeleitet. Es flossen in dieser Zeit ca. 4 Liter durch. Ein bedeutender Theil (ca. 600 C.-Ctm.) durchdrang die Nierenkapsel; dieser

mit dem aus der Vene geflossenen Serum zusammen untersucht. Aus den Ureteren floss keine Flüssigkeit. Bei der Prüfung des durchgeleiteten Serum auf Hippursäure krystallisierte aus dem zuletzt erhaltenen Tropfen Syrup trotz tagelangen Stehens keine Hippursäure. Nach Anwendung von Zinkoxyd wurde — neben anderen mikroskopischen Krystallen, welche wir auch bei der Untersuchung des normalen Rindsblutes beobachtet hatten — eine sehr geringe Menge mikroskopischer Nadeln gefunden, welche möglicher Weise Hippursäure waren. — Jedenfalls handelte es sich um eine unwägbarbare Spur.

Versuch XXVI.

Um 8 Uhr morgens wird ein grosser Hund durch Verbluten aus der Carotis getötet; — es wird ein Liter Blut gewonnen und auf die Centrifuge gebracht. Um 11 Uhr werden einem zweiten Hunde ca. 600 C.-Ctm. Blut entzogen und gleichfalls centrifugiert. Der Hund bleibt leben. Es werden im Ganzen 600 C.-Ctm. vollkommen klaren Serums erhalten. Um 6 Uhr wird der Hund durch Verbluten getötet. Eine Niere wird herausgeschnitten und Serum durch dieselbe geleitet. Nachdem 150 C.-Ctm. durchgeflossen sind, ist das herausfliessende Serum vollkommen klar. Das übrige Serum wird mit 0,5 Benzoesäure als Natronsalz und einer äquivalenten Menge Glykokoll versetzt und $3\frac{1}{2}$ Stunden (von $6\frac{1}{2}$ — 10 Uhr) durch die Niere geleitet. In dieser Zeit floss die ganze Serummenge (450 C.-Ctm.) 9 mal durch die Niere. Durch die Nierenkapsel drang nur wenig Serum; dieses wurde filtriert und, mit dem übrigen Serum vereinigt, wiederum durchgeleitet. Aus dem Ureter floss keine Flüssigkeit. — Es liess sich nur Benzoesäure und keine Spur von Hippursäure in dem durchgeleiteten Serum nachweisen: es wurde zuletzt ein kleiner Tropfen einer syrupösen Flüssigkeit erhalten, aus dem nach Ständigem Stehen keine Spur von Krystallen sich ausschied. Der Tropfen wurde darauf nochmals in etwas Wasser gelöst, mit Essigäther ausgeschüttelt u. s. w. Aber auch so liess sich keine Spur Hippursäure nachweisen.

Man ersieht aus diesen Versuchen, dass bei der Bildung der Hippursäure in der Niere die Blutkörperchen eine wesentliche Rolle spielen.

Die geringe Spur von Hippursäure, welche in den Versuchen XXII, XXIII und XXIV gefunden wurde, erklärt sich vielleicht daraus, dass die Kochsalzlösung — welche ein rasches Aufquellen des Nierengewebes und Verstopfung der Capillaren bewirkt — die Blutgefässe nicht so

vollständig ausgespült und von allen Körperchen befreit hatte wie das Serum. In der That beobachteten wir, dass die durchgeleitete Kochsalzlösung allmählich eine merklich rothe Färbung annahm.

Welcher Art die Rolle der Blutkörperchen bei der Hippursäurebildung ist, haben wir noch nicht ermitteln können. Es liegt die Vermuthung nahe, dass sie nur als Sauerstoffträger wirken. Ob dieses thatsächlich der Fall ist, muss sich auf experimentellem Wege mit voller Sicherheit entscheiden lassen. Man könnte den Sauerstoff aus dem Blute durch Kohlenoxyd oder besser durch ein indifferentes Gas, etwa Stickstoff verdrängen, oder Erstickungsblut oder durch künstlichen Zusatz reducirender Substanzen sauerstofffrei gemachtes Blut anwenden und solches Blut nach Zusatz von Benzoessäure und Glykokoll unter Abschluss der atmosphärischen Luft durch die Nieren leiten. Würde auch in diesem Falle Hippursäure gebildet, so wäre damit entschieden, dass die Blutkörperchen nicht als Sauerstoffträger sondern in anderer Weise bei der Bildung der Hippursäure mitwirken.

Dass mit Hilfe der Durchleitungsversuche an der ausgeschnittenen Niere noch eine Reihe anderer, wichtiger Fragen über die Vorgänge des Stoffwechsels im Thierkörper, insbesondere über den Ort der Harnstoffbildung, über die Vorstufen des Harnstoffes u. s. w. sich könnte entscheiden lassen, brauchen wir wohl kaum hervorzuheben. Von besonderem Interesse scheint es uns, zu untersuchen, ob das kohlen saure Ammon, dessen Umwandlung in Harnstoff beim Durchtritt durch den Thierkörper neuere Beobachtungen wahrscheinlich machen, diese Umwandlung in den Nieren erleidet. Dieses wäre ein der Hippursäurebildung vollkommen analoger Process. Bisher haben wir den Versuch nicht ausgeführt, weil es uns noch nicht gelungen ist, eine für unsere Zwecke genügend genaue Methode des Nachweises und der quantitativen Bestimmung des Harnstoffes ausfindig zu machen.

Strassburg i. E., den 12. August 1876.
