



Over de moederstof van het z.g. skatolrood in normale menschelijke urine

<https://hdl.handle.net/1874/255198>

A. QU. 192

1905

J. Ph. STAAL

Over de moederstof van
het z.g. Skatolrood in
normale menschelijke
urine. ☞ ☞ ☞ ☞ ☞ ☞

A. qu.
192

Over de moederstof van het
z.g. Skatolrood in normale
menschenlijke urine. ≡ ≡ ≡

A gw 19.2 1905

**Over de moederstof van
het z.g. Skatolrood in
normale menschelijke
urine. ☞ ☞ ☞ ☞ ☞ ☞**

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van den graad van Doctor in de Geneeskunde aan de Rijks-Universiteit te Utrecht, na machtiging van den Rector Magnificus Dr. F. A. F. C. Went, Hoogleraar in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, volgens besluit van den Senaat der Universiteit tegen de bedenkingen van de Faculteit der Geneeskunde te verdedigen op Donderdag 21 September 1905, des nam. ten 4 ure, door JOHANNES PHILIPPUS STAAL, Arts te Utrecht, geboren te Utrecht.



ARNHEM
Firma G. W. VAN DER WIEL & Co.
1905.

De Nederlandsche
Nieuw-Zeelandische
Normale Hogeschool
te Amsterdam

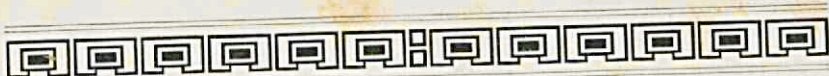
VERGADERING

Van de Directie der
Nieuw-Zeelandische
Normale Hogeschool
te Amsterdam
Dinsdag den 10
Februarij 1885
Afspraak om 9
uur 's ochtts
in de vergadering
zaal der Directie
der Nieuw-Zeelandische
Normale Hogeschool
te Amsterdam



Universiteitsbibliotheek
te Amsterdam

Aan mijne Vrouw.



Allen, wier leiding of omgang tot mijne vorming hebben bijgedragen, wensch ik hier mijnen hartelijken dank te betuigen.

Voor al aan U, Hooggeleerde PEKELHARING, Hooggeachte Promotor, gevoel ik mij ten zeerste verplicht, zoowel voor den zeer gewaardeerden, steeds zoo bereidwillig gegeven, raad en steun, als voor de belangstelling, die Gij gedurende het geheele onderzoek in mijn werk hebt getoond.

En evenzeer gevoel ik mij tot dank verplicht aan U, Hooggeleerde VAN ROMBURGH, die steeds Uwe tijd en kennis tot mijne beschikking stelt en gastvrij mij den toegang tot Uw laboratorium verleendet.

En het zal U niet verwonderen, Hooggeleerde TALMA, dat Gij, tot wien ik als assistent in nauwere betrekking heb gestaan, in mijne herinnering eene bijzondere plaats blijft innemen.

I.

Verschillende onderzoekers hebben in de laatste vijftig jaren in normale of pathologische urine roode kleurstoffen gevonden of op eenvoudige wijze daaruit kunnen verkrijgen, zonder dat daardoor omtrent den aard der kleurstoffen of hare chromogenen in het algemeen voldoende kennis is verkregen. De beschreven kleurstoffen waren meestal onzuiver; waarschijnlijk zullen dezelfde kleurstoffen of mengsels van kleurstoffen door verschillende onderzoekers zijn gevonden en van verschillende namen zijn voorzien. De namen geven ook weinig inzicht. Voor een gedeelte zijn de benamingen uit twee componenten samengesteld, waarvan de eene component op de afkomst uit urine en de andere op de roode kleur wijst, zooals de uroroseïne van Nencki en Sieber ¹⁾, de urrhodine van Heller ²⁾, de urorubine van Plosz ³⁾; voor een ander deel zijn die kleurstoffen in de litteratuur bekend onder den naam van haren ontdekker, zooals de kleurstof van Leube ⁴⁾, van Thormälen ⁵⁾.

1) Journ. f. prakt. Ch. 1882. N. F. XXVI pag. 333: Ueber das Urorosein.

2) Heller's Arch. 1845. pag. 161, 1846. pag. 19, 536, 539: Ueber die Farbstoffe des Harns, gecit. bij Neubauer u. Vogel, Harnanalyse, 9 Aufl. 1890. pag. 96.

3) Z. f. Physiol. Chemie VI pag. 504: Ueber einen neuen farbigen Harnbestandtheil en Z. f. Physiol. Ch. VIII pag. 85: Ueber einige Chromogene des Harns u. deren Derivate.

4) Virchow's Arch. CVI pag. 418: Ueber einen neuen path. Harnfarbstoff.

5) Virchow's Arch. CVIII pag. 317: Mittheilungen über einen noch nicht bekannten Körper in path. Menschenharn.

Onder de verschillende uit urine verkregen roode kleurstoffen hebben vooral twee in het bijzonder de belangstelling opgewekt, n.l. het indigorood (met zijne modificatie: het indigoblauw) en het z.g. skatolrood, vooral ook, omdat men ze als eenen maatstaf beschouwde bij de beoordeeling der rottingsverschijnselen in den darm.

Van deze beide kleurstoffen is het indigorood (resp. blauw) en zijn chromogeen goed bekend. Dit chromogeen is ook uit urine bereid kunnen worden door Baumann en Brieger ¹⁾, die tevens aantoonde, dat dit chromogeen, tot dusverre urine-indican geheeten en identisch met planten-indican gedacht, niet, zooals dit een glycosied is, maar een zuur, dat bij behandeling met HCl zwavelzuur afgeeft. Analyses deden dit chromogeen kennen als indoxylzwavelzuur, analoog aan andere, door Baumann in urine aangetoonde, gepaarde zwavelzuren van aromatische verbindingen. Het indoxylzwavelzuur bleek zoowel indigoblauw als indigorood te kunnen leveren en dank zij eene rijke litteratuur (Rosin, Wang, Maillard, Bouma, Ellinger e.a.) over dit onderwerp, bestaan omtrent de hoofdzaken geene meningsverschillen meer.

Van de tweede kleurstof, het z.g. skatolrood, dat zich van het indigorood duidelijk onderscheidt door zijne onoplosbaarheid in chloroform, kan niet hetzelfde worden gezegd. Wel wordt na de ontdekking van het skatol aan eene bepaalde kleurstof uit urine de naam skatolrood gegeven en skatoxylzwavelzuur als het chromogeen beschouwd, maar toch heeft men tot nog toe geene zekerheid hieromtrent verkregen, niettegen-

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. III pag. 254: Ueber Indoxylschwefelsäure, das Indikan des Harns.

staande bedoelde urinekleurstof in bereidingswijze en eigenschappen overeenkomst vertoont met eene roode kleurstof, die uit skatolderivaten is te verkrijgen. De geschiedenis van deze kleurstof en van skatol valt echter geheel samen.

Het skatol werd door Brieger ¹⁾ onder de distillatieprodukten van menschelijke faeces ontdekt. Toen hij n.l. het distillaat uit met azijnzuur zuur gemaakte faeces, na neutralisatie, met aether uitschudde en van deze aetherische oplossing den aether afdistilleerde, bleef een olieachtig residu over, dat door koken met water, bij afkoeling, de nieuwe stof liet uitkristalliseeren. De kristallen hebben faecalen reuk, smelten bij 94 à 95° C. en lossen moeilijker in water op dan indol. Met HCl en choorkalk geven zij geene roode kleur; rookend HNO₃ veroorzaakt in de waterige oplossing eene witte troebelheid. In faeces van honden en van typhuslijders heeft hij nooit skatol gevonden. Na subcutane injectie van skatol bij konijnen, verschijnt in de urine een chromogeen, dat met HCl en chloorkalk eene roode of violette kleur geeft.

Door analyse en bepaling der dampdichtheid vindt Brieger ²⁾ als moleculairformule: C₉H₉N, overeenstemmende met de door Nencki ³⁾ bepaalde samenstelling. Na subcutane injectie van skatol bij konijnen en kikkers vindt hij in de urine eene vermeerdering van het gepaarde zwavelzuur.

Het gelukte hem skatol te verkrijgen door rotting

¹⁾ Ber. d.d. chem. Ges. X pag. 1027: Ueber die flüchtigen Bestandtheile der menschl. Exeremente.

²⁾ Ber. d.d. ch. Ges. XII pag. 1985: Ueber Skatol.

³⁾ Journ. f. prakt. Ch. 1879. N. F. XX pag. 466: Die empirische Formel des Skatols.

van bloedeiwit. Ook Nencki ¹⁾ had het reeds verkregen door rotting van vleesch en pancreas. Langzamerhand bleek het een constant rottingsprodukt van eiwit te zijn: E. en H. Salkowski ²⁾ verkregen het in wisselende hoeveelheden bij rotting van vleesch; Nencki ³⁾ bij rotting van runderhersen; Brieger ⁴⁾ bij rotting van fibrine, kippeneiwit, lever, caseïne.

Het kon nu ook gemakkelijker worden aangetoond, omdat Brieger ⁴⁾ in het pikraat een middel vond om het van indol te scheiden.

Gebruik makende van de gelegenheid om skatol in grootere hoeveelheid te bereiden, gaf Brieger ⁴⁾ aan een hond in 2 dagen ca 7 gr. skatol. De hoeveelheid gepaard zwavelzuur der urine was daarna ca 4 maal zoo groot als vóór de proefneming. Hij beproefde toen, op analoge wijze als Baumann en Brieger ⁵⁾ het indoxyl-zwavelzuur uit urine hadden bereid, de verbinding af te scheiden, waarin het skatol in de urine was overgegaan. Hij verkreeg slechts enkele kristallen, die in een droog reageerbuisje verhit, roode dampen leverden, terwijl het residu met BaCl_2 een praecipitaat van BaSO_4 gaf.

Ook de waterige oplossing der kristallen gaf na koken met HCl , waardoor eene roode kleur ontstond, met BaCl_2 een praecipitaat van BaSO_4 . Hij vond hierin reden genoeg om aan te nemen, dat het skatol

¹⁾ Journ. f. prakt. Ch. 1879. N. F. XX pag. 466: Die empirische Formel des Skatols.

²⁾ Ber. d.d. Ch. Ges. XII pag. 648: Weitere Beiträge z. Kenntniss der Fäulnisprodukte des Eiweisses.

³⁾ Z. f. Physiol. Ch. IV pag. 371: Z. Kenntniss der Skatolbildung.

⁴⁾ Z. f. Physiol. Ch. IV pag. 414: Weitere Beiträge z. Kenntniss des Skatols.

⁵⁾ Z. f. Physiol. Ch. III pag. 254: Ueber Indoxylschwefelsäure, das Indikan des Harns.

als skatoxylzwavelzuur met de urine werd uitgescheiden.

De, door koken met HCl uit de onzuivere produkten dezer bereiding verkregen, roode kleurstof scheidde zich bij afkoeling af. Zij is onoplosbaar in aether en water, oplosbaar in alkohol. Bij verdamping van den alkohol verandert zij in eene bruine amorphe kleurstof, die onoplosbaar is in alkohol, aether en water. Met zinkstof verhit geeft de kleurstof den reuk van skatol. Analyses van de kleurstof leverden geene overeenstemmende resultaten.

Een paar jaren later (1884) deed Otto ¹⁾ eene interessante mededeeling: Het was hem gelukt uit de urine van eenen diabeteslijder skatoxylzwavelzuur af te scheiden. Dit is de *eenige* maal, dat uit urine skatoxylzwavelzuur kon worden bereid. Bemerkende, dat de urine van den diabeteslijder rijk was aan skatolroodchromogeen en aan gepaard zwavelzuur, deed hij eene poging om volgens Brieger's methode het skatoxylzwavelzuur te bereiden en wel met gunstig resultaat.

Eene N-bepaling en twee H_2SO_4 -bepalingen gaven resultaten, die goed overeenstemden met de formule: $C_9 H_8 N O S O_3 K$. Op deze bepalingen steunt hij zijne conclusie, dat de gevonden stof werkelijk skatoxylzwavelzuur is, waartegen m. i. nog wel iets zou zijn in te brengen! De eigenschappen der gevonden stof kwamen overeen met hetgeen Brieger had medegedeeld. Skatolcarbonzuur kon hij niet uit deze urine verkrijgen; wel een bruine olie, die na 14 dagen rotting naar skatol rook, maar wier hoeveelheid te gering was om analyse toe te laten. Deze olie gaf met rookend

¹⁾ Pflüger's Arch. XXXIII pag. 607: Das Vorkommen grosser Mengen von Indoxyl- u. Skatoxylschwefelsäure im Harn bei Diabetes mellitus.

HNO_3 eene roode kleurstof. Reeds Brieger ¹⁾ en Salkowski ²⁾ hadden bij eiwitrotting eene dergelijke bruine olie aangetroffen.

Eene belangrijke bijdrage tot de kennis der skatolverbindingen brachten de onderzoekingen van E. en H. Salkowski ³⁾. Verschillende eiwitsoorten werden bij alkalische reactie en zoo noodig na toevoeging van voedingszouten in gesloten kolven door rioolmodder tot rotting gebracht. Na afloop der rotting werd het daardoor verkregen produkt aan distillatie onderworpen. Onder de talrijke vluchtige ontledingsproducten vinden zij: indol, skatol, en eene bruine stinkende olie, die met HNO_2 -vrij HNO_3 eene roode kleur gaf. In dit opzicht wijkt dus deze olie af van de reeds boven beschreven olie.

Ook in het, na distillatie overgebleven, residu bleek nog een skatolderivaat aanwezig te zijn. (z. pag. 7.)

Niet alle eiwitsoorten geven dezelfde hoeveelheden indol en skatol. Zoo ontstaat o.a. door rotting uit fibrine 7,2 — 11,5 ‰ skatolhoudend indol, uit vleesch 1,7 — 5,8 ‰, uit z.g. «vleeschfibrine» 2,8 — 3,4 ‰. Het skatolgehalte van het bij rotting ontstane skatolhoudend indol is zeer wisselend. Dit varieert van 0 ‰ — bijna 100 ‰ van het mengsel, zonder dat de oorzaken van deze schommelingen konden worden opgespoord, (bacteriën?). Indol en skatol komen derhalve constant voor onder de ontledingsprodukten, en wel in dier voege,

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. III pag. 134: Ueber die aromatischen Produkte der Fäulniss aus Eiweiss.

²⁾ Z. f. Physiol. Ch. II pag. 420: Z. Kenntniss der Pankreasverdauung.

³⁾ Z. f. Physiol. Ch. VIII pag. 417: Z. Kenntniss der Eiweissfäulniss I. Z. f. Physiol. Ch. IX pag. 8: Z. Kenntniss der Eiweissfäulniss II.

Ber. d. d. Ch. Ges. XIII pag. 189: Weitere Beiträge z. Kenntniss der Fäulnissprodukte aus Eiweiss.

dat het indol geheel of gedeeltelijk voor het skatol in de plaats kan treden. Beide onderzoekers meenen dan ook in het eiwitmolecuul een atoomcomplex te moeten aannemen, waaruit beide stoffen ontstaan. Indol ontbreekt nooit geheel, skatol eene enkele maal. In de verschillende eiwitsoorten schijnt de indolgroep van ongelijke grootte te zijn.

In enkele punten wijken hunne resultaten van die van andere onderzoekers af:

Zij vinden meer indol dan andere onderzoekers (Brieger, Odermatt.), hetgeen zij daaraan toeschrijven, dat deze het eiwit in open schalen lieten rotten, waardoor het indol kon verdampen, en dat zij geene rekening hielden met het niet in oplossing gegane eiwit.

Met den duur der rotting neemt de hoeveelheid indol toe. Andere onderzoekers hadden dit niet gevonden, wat eveneens op rekening der verdamping kan worden gesteld.

Het indol schijnt niet onmiddellijk uit het eiwit te worden gevormd, maar eerst schijnt eene tusschenstof te ontstaan, want de hoeveelheid indol neemt bij de rotting in sterkere progressie toe dan de hoeveelheid eiwit, die in oplossing is gegaan.

Met indol wordt hierbij natuurlijk bedoeld: skatolhoudend indol.

Het skatolderivaat, dat na distillatie in het residu achterbleef, bleek te zijn: skatolcarbonzuur $C_{11}H_9NO_2$.

Dit is een éénbasisch zuur, dat in kleine plaatjes kristalliseert, die gemakkelijk in alcohol en aether en moeilijk in water oplossen. Smeltpunt: $164^{\circ}C$. Boven het smeltpunt verhit, ontleedt het zich in skatol en CO_2 . Het kan gemakkelijk worden aangetoond door de volgende gevoelige reacties: De waterige oplossing geeft

niet een paar druppels HNO_3 en een paar druppels 2 % KNO_2 -opl. eene roode kleurstof, die uitgeschud kan worden door azijnaether en amylalkohol, doch niet door aether en chloroform. Bij spektroskopisch onderzoek geeft de kleurstof eene streep in het groen; door alkaliën wordt de roode kleur eene bruine. Dezelfde kleurstof met dezelfde eigenschappen, behalve dat zij zich niet door azijnaether laat uitschudden, ontstaat, wanneer men aan de waterige oplossing van skatolcarbonzuur toevoegt: HCl en chloorkalk of 2 à 3 dr. HCl en 2 à 3 dr. Fe_2Cl_6 -opl. (0,2:100).

De hoeveelheid skatolcarbonzuur neemt met den duur der rotting toe. In alkalische oplossing wordt het moeilijk ontleed. Hoewel beide onderzoekers geneigd blijven, om, gelijk zij reeds vroeger hadden gemeend, ¹⁾, het skatolcarbonzuur te beschouwen als het tusschenprodukt tusschen eiwit en skatol, resp. indol, geven zij toe, dat deze beide bijzonderheden daartegen pleiten.

Een enkele maal vonden zij na rotting geen skatolcarbonzuur, maar een ander zuur met smeltpunt: 134°C. , dat zij evenwel niet analyseerden.

Later heeft E. Salkowski ²⁾, naar aanleiding van Nencki's onderzoekingen, dit zuur nog onderzocht en gevonden, dat het skatolazijnzuur was.

Na subcutane injectie van skatolcarbonzuur bij konijnen vond E. Salkowski ³⁾ een gedeelte onveranderd in de urine terug, terwijl hij omtrent het lot van de rest niets kon gewaar worden. Hij meent, dat skatolcarbonzuur ook in menschelijke urine voorkomt.

¹⁾ Ber. d.d. chem. Ges. XIII pag. 2217: Ueber die skatolbildende Substanz.

²⁾ Z. f. Physiol. Ch. XXVII pag. 302: Ueber das Vorkommen der Skatol-essigsäure bei der Eiweissfäulniss.

³⁾ Z. f. Physiol. Ch. IX pag. 23: Ueber das Verhalten der Skatolcarbon-säure im Organismus.

Aan de skatolgroep van het eiwit schrijft E. Salkowski ¹⁾ de reactie van Adamkiewicz toe en eveneens de xanthoproteïne-reactie.

Daar intusschen Fischer ²⁾ synthetisch skatol uit phenylhydrazinpropylaldehyde had bereid, heeft Mester ³⁾ nog eens nagegaan, welke resultaten hij kon verkrijgen door aan honden groote hoeveelheden skatol toe te dienen. Een flinke hond kreeg in 3 weken 30 gr. skatol. De urine gaf door toevoeging van sterk HCl, vooral bij verwarming, eene sterke skatolrood-reactie. Zij reduceerde alkalische koperoplossing en in den polarimeter gaf zij eene linksdraaiing van $1,5^\circ$ bij eene buislengte van 20 c.M. De hoeveelheid gepaard zwavelzuur was sterk vermeerderd. Toch kon hij geen skatoxylzwavelzuur uit deze urine verkrijgen. Bij eene tweede proef was de hoeveelheid gepaard zwavelzuur niet vermeerderd, hoewel de urine veel skatolrood leverde. Met nog andere proefhonden vielen de resultaten geheel verschillend uit. In het gunstigste geval beantwoordde de vermeerdering van gepaard zwavelzuur hoogstens aan $\frac{1}{5}$ gedeelte van het opgenomen skatol. Analyses van de kleurstof gaven geene overeenstemmende resultaten. Hij concludeert dan ook, dat de analogie met indol niet zoover gaat als algemeen wordt aangenomen en vermoedt, dat het skatol misschien als gepaard glycuronzuur wordt afgescheiden, zonder evenwel aan te toonen, dat de reduceerende en linksdraaiende eigenschappen der urine van het chromogeen afhankelijk zijn.

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. XII pag. 215: Ueber die Farbenreactionen des Eiweisses.

²⁾ Liebig's Ann. CCXXXVI pag. 137: Synthese von Indolderivaten.

³⁾ Z. f. Physiol. Ch. XII pag. 130: Ueber Skatoxylschwefelsäure u. Skatolfarbstoff.

Onlangs gepubliceerde onderzoeken van Grosser ¹⁾ bevestigen in hoofdzaak Mester's mededeelingen. Na toediening van skatol aan konijnen (subcutaan of per os) vindt hij slechts in het begin eene toeneming van gepaard zwavelzuur. Zoodra het organisme aan het skatol was gewend, werd de hoeveelheid gepaard zwavelzuur normaal en scheen het skatol zich in verbinding met andere stoffen af te scheiden (glycuronzuur ?).

De kleurstof, uit urine van op dergelijke wijze behandelde dieren verkregen, gaf bij distillatie met zinkstof skatol.

Een nieuw skatolderivaat werd door de onderzoeken van Nencki ²⁾ bekend. Bij rotting van eiwit door bepaalde anaërobe bacteriën (n.l. *Bac. liquefaciens magnus*, *Bac. spinosus* en den «Rauschbrand» bacillus) in eene CO_2 -atmosfeer, verkreeg hij geene vluchtige produkten uit de indolgroep, maar bleken onder de niet vluchtige rottingsprodukten steeds aanwezig te zijn: phenylpropionzuur, paraoxyphenylpropionzuur en skatolazijnzuur.

Het skatolazijnzuur $\text{C}_6\text{H}_4 \begin{matrix} \text{C} \\ \text{NH} \end{matrix} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{C} \end{matrix} \text{CH}_2\text{COOH}$ kristalliseert in prisma's of onregelmatig getande zeszijdige plaatjes.

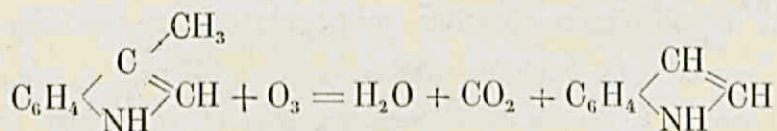
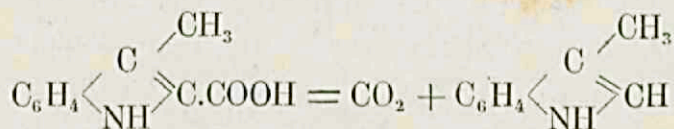
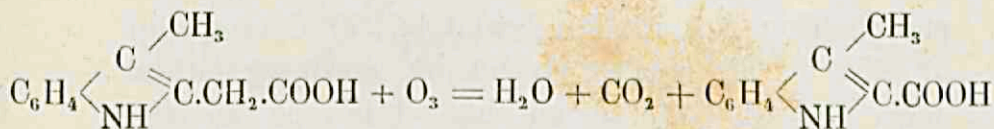
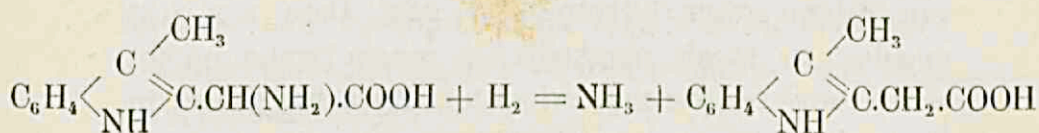
Het lost moeilijk in koud en makkelijk in warm water op. Het smelt bij 134°C ., kan tot 200°C . worden verhit zonder ontleding; bij koken wordt het bruin en geeft skatollucht. In waterige oplossing geeft

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. XLIII pag. 321: Ueber das Verhalten von zugeführtem Indol u. Skatol im Organismus.

²⁾ Ber. d. k. Akad. d. Wiss., Math.-Nat. Wiss. Cl. XCVIII Abth. IIb pag. 347: Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweisses durch anaërobe Spaltpilze.

het met Fe_2Cl_6 een witte troebelheid, die bij verwarming rood wordt. Voegt men bij eene oplossing van skatolazijnzuur eene geconcentreerde oplossing van KNO_2 en een weinig azijnzuur, dan praecipiteert zeer spoedig (quantitatief) nitrososkatolazijnzuur in gele naaldjes.

Het constant voorkomen van de drie bovengenoemde zuren doet hem aannemen, dat in het eiwit-molecuul de drie volgende aromatische groepen voorkomen: paraoxyphenylamidopropionzuur (tyrosine), phenylamidopropionzuur en skatolamidoazijnzuur. En dat, gelijk bij rotting uit tyrosine door reductie het paroxyphenylpropionzuur wordt gevormd, uit de beide andere amidozuren het phenylpropionzuur en het skatolazijnzuur ontstaan. Het skatolazijnzuur is dan weer de bron van het skatolcarbonzuur, het skatol en het indol:



Het hangt van de omstandigheden af, welk eindprodukt wordt gevormd. Tot die omstandigheden behooren temperatuur, toetreding of afsluiting van

zuurstof, soort der bacteriën. Laat men n.l. eiwit rotten door het sereuse vocht uit de gezwollen van dieren, die aan «Rauschbrand» lijden, waarin ook de *Micrococcus acidi paralactici* voorkomt, dan vindt men onder de ontledingsproducten groote hoeveelheden skatol, wat, bij rotting door den «Rauschbrand» bacil alleen, nooit voorkomt.

Bij eene dergelijke rotting van lijm ontstaat nooit tyrosine, indol of skatol (Selitrenny) ¹⁾.

Zeer interessant zijn ook de onderzoeken van Cole en Hopkins ²⁾, die eene schoone bevestiging leveren van Nencki's hypothese omtrent de moederstof van het skatol etc. in het eiwitmolecuul. Uit de produkten, verkregen bij pancreasdigestie van eiwit (speciaal caseïne), konden zij eene stof afzonderen, die de reactie van Adamkiewicz (glyoxylzuur) gaf. Deze stof lost moeilijk in koud, makkelijk in warm water op tot eene zuur reageerende vloeistof. Zij kristalliseert in fijne witte glinsterende plaatjes, die geen scherp smeltpunt hebben. Het smelten begint bij 220° C. en eindigt bij 252° C. Bij verdere verhitting wordt zij ontleed onder CO₂-ontwikkeling en ontstaat de reuk van indol en skatol. Deze is het totnogtoe niet afgescheiden tryptophaan van Neumeister ³⁾. De analyse leidde tot de formule C₁₁ H₁₂ N₂ O₂, overeenstemmende met de empirische formule van Nencki's skatolamidoazijnzuur. Een tryptophaanoplossing met gelatine en voedings-

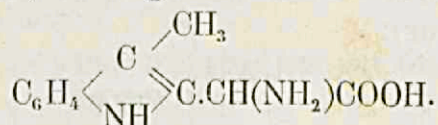
¹⁾ Ber. d. k. Akad. d. Wiss., Math.-Nat. Wiss. Cl. XCVIII Abth. III pag. 870: Ueber die Zersetzung des Leimes durch anaërobe Spaltpilze.

²⁾ Journ. of Physiol. XXVII pag. 418: Chemistry of proteids I.

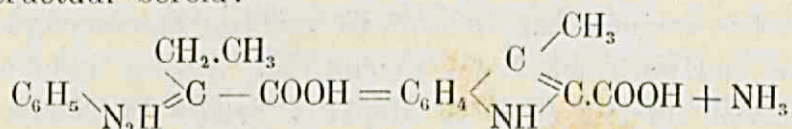
Journ. of Physiol. XXIX pag. 451: Chemistry of proteids II.

³⁾ Z. f. Biologie N. F. VIII pag. 329, Noot: Ueber die Reactionen der Albumosen u. Peptonen.

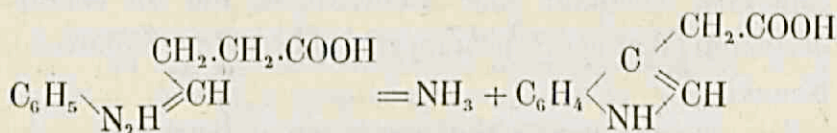
zouten, geënt met aërobe bacteriën, leverde skatol, indol en skatolcarbonzuur; eene dergelijke oplossing, geënt met anaërobe bacteriën, daarentegen skatolazijnzuur. Door smelten van tryptophaan met KOH ontstaat skatol, NH_3 en oxaalzuur. Zij concludeeren derhalve dat tryptophaan skatolamidoazijnzuur is en geven daaraan, overeenkomstig Nencki's formule van skatolazijnzuur, de volgende structuurformule:



Deze structuurformule schijnt evenwel niet juist te zijn. Wislicenus en Arnold ¹⁾ hadden reeds aangetoond, dat aan het door rotting uit eiwit verkregen skatolcarbonzuur eene met bovenstaande formule homologe formule niet toekomt. Door hen was uit phenylhydrazinpropionylmierenzuur skatolcarbonzuur met deze structuur bereid:



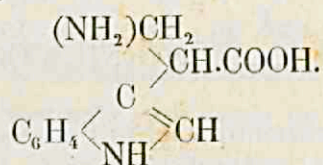
dat niet identisch was met «rottings»skatolcarbonzuur. Eenigen tijd daarna kon Ellinger ²⁾ uit phenylhydrazin- β -aldehydopropionzuur eene stof bereiden, die daarmede wel identisch was:



¹⁾ Liebig's Ann. CCXLVI pag. 334: Ueber die Synthese von Keton-säure-estern.

²⁾ Ber. d. d. ch. Ges. XXXVII pag. 1801: Ueber die Constitution der Indolgruppe aus Eiweiss.

Het z. g. skatolcarbonzuur uit eiwit blijkt dus te zijn indolazijnzuur. Dienoverkomstig moet dus ook de structuurformule van skatolazijnzuur en skatolamidoazijnzuur veranderen. Voor deze laatste verbinding bestaan derhalve, in verband met de plaats der NH_2 -groep, vier mogelijkheden. Nu wordt tryptophaan bij honden als kynurenzuur uitgescheiden en dus kiest hij als structuurformule van tryptophaan (resp. skatolamidoazijnzuur):



Natuurlijk brengt de betere kennis dezer structuurformules geene verandering in de conclusies van Salkowski, Nencki, Cole en Hopkins omtrent de aromatische groepen van het eiwitmolecuul.

Het is dus wel begrijpelijk, dat men:

1o. wegens het voorkomen van een atoomcomplex in het eiwitmolecuul, waaruit bij rotting indol en skatol ontstaat (Cole en Hopkins, Salkowski, Nencki);

2o. wegens den overgang van indol in indoxylzwavelzuur resp. glycuronzuur;

3o. wegens het voorkomen van eene kleurstof in urine, die in eigenschappen en bereidingswijze overeenkomst vertoont met kleurstoffen, die uit skatolderivaten (skatolcarbonzuur) zijn te bereiden (Salkowski, Nencki);

4o. wegens eene aangenomen (niet bewezen!) vermeerdering van die kleurstof in de urine van dieren, welken men skatol bij hunne voeding had gegeven (Brieger, Mester, Grosser);

5o. wegens eene (wel is waar niet constante) toe-

neming van de hoeveelheid gepaard zwavelzuur in de urine van dergelijke dieren (Brieger, Mester, Grosser) en het aantoonen van skatoxylzwavelzuur (?) in de urine van een diabeteslijder (Otto);

aanneemt, dat skatoxylzwavelzuur de moederstof is van het z. g. skatolrood. Eveneens is het begrijpelijk, dat Mester bovendien nog skatoxylglycuronzuur als de moederstof beschouwt, al steunt zijne conclusie op zwakke gronden.

Stokvis ¹⁾, die eene methode aangaf om de moederstof van het z. g. skatolrood uit urine af te scheiden, kon echter geen gepaard zwavelzuur of glycuronzuur aantoonen en hield het chromogeen voor skatolazijnzuur of skatolcarbonzuur. Dat het chromogeen in staat zou zijn methaemoglobine te leveren, wanneer het met haemoglobine in aanraking komt, gelijk Stokvis meende, is door Steensma ²⁾ bewezen onjuist te zijn.

Hoe algemeen dan ook het skatoxylzwavelzuur als het chromogeen van het z. g. skatolrood wordt beschouwd, toch is deze hypothese niet zonder bestrijders gebleven.

Reeds in 1891 wees Rosin ³⁾ er op, dat al hetgeen omtrent het voorkomen van skatolrood in urine was medegedeeld, onbewezen hypothese was. Bij zijn onderzoek had hij nooit eene dergelijke kleurstof aangetroffen en alle roode kleurstoffen, die hij had gevonden,

¹⁾ Tijdschr. v. Gen. 1901. I pag. 961 en Hand. Ned. Nat.-en Geneesk. Congr. 1901. pag. 249: Over de scheiding der moederstof van het indigoblauw van die van het skatolrood in de urine van den mensch.

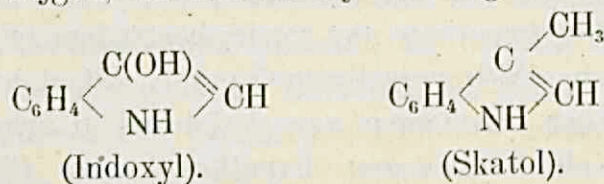
Tijdschr. v. Geneesk. 1902. II pag. 678: Bijdrage tot de casuïstiek der autotoxische enterogene cyanosen.

²⁾ Tijdschr. v. Geneesk. 1904. II pag. 425: Over het voorkomen van nitrieten in urine en hunne beteekenis voor het qual. en quant. urine-onderzoek.

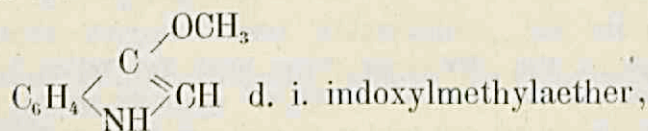
³⁾ Virchow's Arch. CXXIII pag. 519: Ueber das Indigoroth.

waren òf indigorood òf eene der andere «bekende» roode urinekleurstoffen, (vooral uroroseïne). Hij vindt het dan ook overbodig om als de oorzaak der roodkleuring in urine skatolderivaten te beschouwen. Het moet echter een raadsel blijven, hoe hij eene in chloroform onoplosbare kleurstof (zooals het z.g. skatolrood is) indigorood kan noemen!

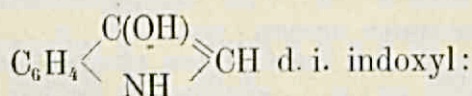
Eveneens een heftig bestrijder vinden wij in Maillard ¹⁾. Hij begint met alle als zoodanig beschreven kleurstoffen als indigorood te beschouwen, derhalve eveneens voorbijziende, dat de z.g. skatolkleurstof *niet* in chloroform oplosbaar is. Zijn andere argumenten hebben meer waarde: Aan het skatoxylzwavelzuur ontzegt hij alle recht van bestaan, omdat niemand het ooit heeft gezien en omdat het begrip skatoxyl onvereinigbaar is met de chemie van de indolgroep. Immers is in het skatol reeds de methylgroep getreden op de plaats, waarop een hydroxyl zou moeten worden gevonden om skatoxyl te verkrijgen, dat aan indoxyl analoog was:



Het invoeren van O op de verlangde plaats zou dus geven òf:



òf:



¹⁾ L'indoxyle urinaire. Paris. Schleicher Frères & Cie. 1903.

Hij heeft dan ook de vaste overtuiging, dat het skatol in het organisme zijn methylgroep verliest en als moederstof van het indigorood in de urine verschijnt. Zijne argumenten zouden echter een ander skatolderivaat als chromogeen niet uitsluiten!

Porcher en Hervieux ¹⁾ hebben zich eerst bij deze meening aangesloten. In eene latere publicatie ²⁾ evenwel komen zij daarop terug. Zij experimenteerden met dieren, wier urine door melkdiët indicanvrij was geworden. Na subcutane injectie van skatol kon uit de urine door HCl eene roode kleurstof worden bereid, die *niet* door chloroform kon worden uitgeschud. Terecht wijzen zij hier nadrukkelijk op dit verschil met indigorood. Zij achten niet onmogelijk, dat het chromogeen een zout is, waaruit door HCl een roodgekleurd zuur wordt vrijgemaakt. Het chromogeen wordt niet gepraecipiteerd door loodacetaat, onvolkomen door basisch loodacetaat, volkomen door kwiknitraat. Omtrent den aard van het chromogeen laten zij zich niet uit. Zij achten de identiteit met uroroseïne van Nencki en Sieber, met purpurine van Golding Bird, met urohaematine van Harley, met de kleurstof van Giacosa en met de skatolkleurstof van Brieger, Mester en Otto zeer waarschijnlijk.

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch., XXXIX pag. 154: Ueber Harnindican.

²⁾ Compt. rend. de l'acad. des sciences de Paris, CXXXVIII pag. 1725: Couleurs urinaires après l'injection du scatol.

II.

Zekerheid omtrent den aard van het skatolroodchromogeen is dus nog niet verkregen. Slechts éénmaal is uit urine van een diabeteslijder eene verbinding verkregen, waarvan het stikstof- en zwavelzuurgehalte met dat van skatoxylzwavelzuur overeenstemde. (Otto). De meening van Maillard en Rosin, dat de z.g. skatolkleurstof wel indigorood zal zijn, wordt niet door bewijzen gesteund. Ook spreekt een belangrijk feit tegen deze meening:

Wanneer men urine met HCl en een oxydeerend middel (b. v. een paar druppels zeer verdunde KNO_3 -oplossing) kookt, kleurt zich de urine rood. Door uit te schudden met choroform kan men een gedeelte der roode kleurstof in de chloroform doen overgaan. Daarna is met amylalkohol steeds nog eene tweede roode kleurstof uit te schudden, die zich èn spektroskopisch èn door zijn onoplosbaarheid in chloroform van het indigorood onderscheidt. Men kan zich bij iedere urine hiervan overtuigen, vooral wanneer men deze eerst behandelt met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (Zie pag. 19).

Evenmin is echter de meening der andere onderzoekers bewezen, dat de kleurstof een skatolderivaat is. De resultaten van Brieger en Mester missen alle bewijskracht, aangezien geen van beiden skatoxylzwavelzuur hebben kunnen verkrijgen. En ook zou hunne conclusie, dat het chromogeen een gepaard zwavelzuur is, zelfs wanneer zij bewezen ware, niet zonder nader bewijs op normale urine mogen worden

toepasselijk verklaard. Bij de toediening van dergelijke betrekkelijk groote hoeveelheden skatol zou het niet te verwonderen zijn, wanneer het organisme op buitengewone wijze deze stof trachtte uit te scheiden.

Feitelijk is dus thans de stand van zaken aldus: In normale urine is aanwezig een chromogeen, waaruit eene goed gedefiniëerde roode kleurstof is te bereiden, zonder dat omtrent den aard van dit chromogeen met zekerheid iets bekend is.

Hieromtrent iets naders te weten te komen, was mijn doel en daartoe was dus noodzakelijk dit chromogeen uit de urine af te scheiden. Daartoe heb ik gebruik gemaakt van de reeds genoemde, door Stokvis aangegeven, methode tot scheiding van de moederstof van het indigoblauw van die van het skatolrood in de urine van den mensch.

Dienovereenkomstig wordt de (normale) urine verzadigd met ammoniumsulfaat en laat men haar staan tot alle praecipiteerbare stoffen (urobiline, uroërythrine, c.q. galkleurstoffen en haematoporphyrine, welke beide laatste stoffen in de gebruikte urine natuurlijk niet voorkwamen), zijn neergeslagen.

Na filtratie wordt het filtraat op een waterbad ingedampt en na afkoeling afgeschonken van het uitgescheiden ammoniumsulfaat, daarna met enkele druppels azijnzuur zuur gemaakt, met azijnaether (2 à 3 maal) uitgeschud en in een scheidtrechter van den azijnaether gescheiden. De lichtgeelgekleurde azijnaether bevat dan de moederstoffen van het indigoblauw en van het skatolrood.

Door 2 à 3 maal met water uit te schudden, is de azijnaether geheel te bevrijden van het indoxylzwavelzuur. De tweede moederstof (n.l. die van het skatolrood)

kan men aan den azijnaether onttrekken door uitschudden met kaliloog. Deze moet zoo sterk zijn, dat de zure reactie van den azijnaether geheel verdwijnt. De kaliloog neemt eene intensief gele kleur aan, terwijl de azijnaether geheel ontkleurd wordt.

Alvorens den azijnaether met kaliloog uit te schudden, heb ik mij door middel van Bouma's reagens¹⁾ (20 mgr. isatine op 1 L sterk HCl.) steeds overtuigd, dat in het laatste water, waarmee de azijnaether uitgewasschen was, geen indoxylzwavelzuur meer overgegaan was en dus de azijnaether geheel daarvan bevrijd was.

De alkalische vloeistof geeft met Bouma's reagens zoo goed als geene verkleuring. Met Obermayer's reagens (2 gram Fe_2Cl_6 op 1 L. zoutzuur van S. G. 1.19) ontstaat geene groene of blauwe kleur, zooals met indican het geval zou zijn, maar eene schoone purperroode kleurstof. Ook door andere oxydeerende middelen is deze kleurstof te bereiden: zoutzuur met choorkalk, zwavelzuur met ammoniumpersulfaat. Ik gebruikte steeds zoutzuur en eene zeer verdunde oplossing van kaliumnitriet (0,2 à 0,5 %), die mij in het gebruik veel gemakkelijker te doseeren bleek. Men moet n.l. zeer oppassen, om niet te sterk te oxydeeren, aangezien dan de roode kleur slechts voorbijgaande of in het geheel niet ontstaat, doch de oplossing lichtgeel wordt. Bij behandeling van deze vloeistof alleen met HCl (dus *zonder* toevoeging van een oxydeerend middel) ontstaat *geen* roode kleurstof. De roode kleurstof vertoont twee absorptiestrepen in het groen tusschen D en E. Zij laat zich aan de waterige oplossing geheel

¹⁾ Onderzoekingen Physiol. Lab. te Utrecht, 1901, 5de reeks II pag. 332 en Z. f. Physiol. Ch. XXXII pag. 82.

door amylalkohol en gedeeltelijk door azijnaether onttrekken. Aether en cloroform doen dit niet. Bij neutralisatie der zure oplossing wordt de kleur geelbruin, terwijl toevoeging van zuur dan de roode kleur weer doet verschijnen.

Steensma ¹⁾ behandelt de urine met basisch loodacetaat in plaats van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na de publicatie van zijn onderzoek heb ik van 1000 c. c. urine de eene helft volgens Stokvis met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de andere helft volgens Steensma met basisch loodacetaat behandeld en daarna beide porties verder bewerkt ter verkrijging van de moederstof, daarbij zorg dragende, dat zij daarna precies dezelfde bewerking ondergingen, wat betreft de hoeveelheid azijnaether, waarmee zij werden uitgeschud, etc.

Het bleek mij, dat bij de behandeling volgens Stokvis meer chromogeen te verkrijgen was, terwijl bij de behandeling volgens Steensma de urine nooit geheel van chromogeen was te bevrijden. De reden is mij eerst later duidelijk geworden. (Zie hoofdst. VI).

De alkalische vloeistof, volgens de methode van Stokvis verkregen, heb ik met azijnzuur geneutraliseerd, voor ik ze aan verdere bewerking onderwierp.

Het chromogeen uit deze vloeistof af te scheiden is mij niet gelukt. Op verschillende wijzen heb ik dit getracht te doen, en wel of door indamping en uitkristallisatie, of door praecipitatie met metaalzouten.

Bij indamping, gedeeltelijk op het waterbad en verder in een exsiccator boven H_2SO_4 , ontstaat eene bruine stroperige massa, die bij mikroskopisch onderzoek

¹⁾ Tijdschr. v. Geneesk. 1904 II pag. 425: Over het voorkomen van nitrieten in urine en hunne beteekenis voor het quant. en qualit. urine-onderzoek.

talrijke kristallen van kaliumacetaat blijkt te bevatten. Het bleek mij onmogelijk dit kaliumacetaat te verwijderen wegens zijne groote oplosbaarheid en ook omdat het chromogeen in dezelfde vloeistoffen oplosbaar resp. onoplosbaar als kaliumacetaat is.

Bij pogingen om door praecipitatie met metaalzouten het chromogeen af te scheiden, bleek, dat een chromogeenhoudend praecipitaat ontstond door Pb, Hg en Ag.

Loodacetaat (basisch en neutraal) praecipiteerde de gezochte stof slechts onvolkomen; zoowel het praecipitaat als het afgefiltreerde en nu veel minder sterk gekleurde filtraat gaven met HCl en KNO_2 de karakteristieke kleur.

Door AgNO_3 werd het chromogeen volkomen neergeslagen. Dit lichtgele praecipitaat werd in het licht in een paar minuten zwart; in het donker bewaard geschiedde hetzelfde in c° een half uur.

Eveneens ontstond een volkomen praecipitatie van het chromogeen door mercuriacetaat (resp. nitraat). Dit was eene geelbruine amorphe stof, die in de gebruikelijke oplossingsmiddelen niet oploste, wel in sterke zuren (HCl.) Bij ontleding van het in water gesuspenderde kwikpraecipitaat door H_2S , ontstond eene zure vloeistof, die, bij gebruik van mercuriacetaat, sterk naar azijnzuur rook, zoodat men bij slot van rekening even ver was als met de oorspronkelijke vloeistof.

Bij gebruik van mercurinitraat zag men na ontleding door H_2S roodkleuring ontstaan; men mag dus wel aannemen, dat in dit geval de eveneens zure vloeistof, behalve het vrijgemaakte HNO_3 , ook een spoor HNO_2 bevatte, wat na het gebruik van mercurinitraat niet zoo erg behoeft te verwonderen. Het door mercurini-

traat neergeslagen chromogeen leverde dan ook reeds bij koken met HCl alleen de roode kleurstof. Door deze eigenschappen was het kwikpraecipitaat niet te gebruiken.

Vervolgens heb ik getracht het chromogeen direct uit den van indican bevrijden azijnaether te verkrijgen door middel van verschillende metaalverbindingen, n.l.: MgCO_3 , BaCO_3 , SrCO_3 , CaCO_3 , ZnCO_3 en Cu(OH)_2 . De beste resultaten werden verkregen met MgCO_3 . De andere metaalverbindingen leverden óf moeilijkheden bij de bereiding op, (zoo verkreeg men met CaCO_3 en BaCO_3 steenharde praeparaten, die slechts met de grootste moeite tot oplossing te brengen waren), óf zij gaven een praeparaat, dat voor het bloote oog reeds telkens verschillen opleverde, zooals b.v. de praeparaten, verkregen met Cu(OH)_2 , die telkens eene verschillende kleur vertoonden.

De bereiding van het magnesiumpraeparaat geschiedt als volgt:

De van indican bevrijde azijnaether wordt in eene glazen kolf gemengd met MgCO_3 , die men gedurende 24 uur laat staan, terwijl men het mengsel van tijd tot tijd omschudt. Daarna wordt de inhoud van de kolf in eene uitdampschaal uitgegoten en laat men den azijnaether geheel aan de lucht verdampen. Men houdt dan eene bruin gekleurde massa over, die gemakkelijk tot poeder is te brengen. Dit poeder wordt met alkohol van 98 % uitgetrokken, en daarna het extract van de rest afgefiltreerd. Zooals men zich gemakkelijk kan overtuigen, is het chromogeen dan geheel in den alkohol overgegaan. De bruingekleurde, neutraal reageerende, oplossing wordt tot droog ingedampt, het residu nogmaals in alkohol van 98 % opgelost, de oplossing ten

overvloede nog eens gefiltreerd en daarna weer tot droog ingedampt (in den exsiccator).

Dit Mg-praeparaat is een geelbruin amorph poeder, dat oplosbaar is in water, alkohol, minerale zuren en alkaliën, onoplosbaar in aether, chloroform en aceton. Bij verbranding laat het eene witte asch na. Bij sublimeren, dat evenals verbranden met een zeer onaangename reuk gepaard gaat, ontwikkelen zich witte dampen en blijft koolstof achter. Het praeparaat heeft een niet onaangename aromatischen geur.

Bij spektroskopisch onderzoek in neutrale, zure en alkalische oplossing worden geen absorptiestrepen waargenomen.

Toevoeging van HCl en een druppel 0,5 % KNO_2 -oplossing aan eene oplossing van het praeparaat doet eene roode kleur ontstaan, die vooral bij verwarming goed voor den dag komt. Door HCl *alleen* blijft de oplossing van het praeparaat *onveranderd*. Hier is dus zeker geen sprake van het vrij maken van een roodgekleurd zuur, maar is eene oxydatienoodig tot de vorming van de kleurstof. Aan de waterige oplossing laat de kleurstof zich gedeeltelijk door azijnaether, geheel door amylalkohol onttrekken; evenwel in het geheel *niet* door *aether* of *chloroform*. Door neutralisatie verandert de roode kleur in eene geelbruine, die door toevoeging van zuur weer rood wordt. Door Zn wordt de zure oplossing van de kleurstof ontkleurd; laten staan aan de lucht of oxydatie roept de roode kleur weer te voorschijn. Bij verhitting van de kleurstof met Zn heb ik nooit skatol- of indolreuk waargenomen.

Bij spektroskopisch onderzoek der roode kleurstof in zure oplossing vindt men twee absorptiestrepen: eene in het begin en eene zwakke aan het eind van

het groen. Verder blijkt, dat het violette gedeelte van het spektrum verduisterd is.

Bij bereiding van de kleurstof uit meer geconcentreerde oplossing van het magnesiumpraeparaat, waartoe natuurlijk meer KNO_3 wordt vereischt, scheidt zich bij afkoeling een gedeelte der kleurstof uit. Dit praecipitaat, afgefiltreerd en uitgewasschen, is in verschen toestand oplosbaar in alcohol en aceton. Laat men het staan, dan neemt het eene bruinzwarte kleur aan en is niet meer door alcohol en aceton tot oplossing te brengen. Alleen sterke minerale zuren lossen het bij koken met een bruine kleur op. Deze oplossing vertoont geen absorptiestrepen, in tegenstelling met de alcoholische oplossing van het versche praecipitaat, die dezelfde spektroskopische eigenschappen heeft als de oorspronkelijke oplossing, waaruit de kleurstof zich heeft afgescheiden.

Het chromogeen in dit magnesiumpraeparaat levert dus eene kleurstof met dezelfde eigenschappen, als die bereid uit de alkalische oplossing, verkregen door uitschudden van den indicanvrijen azijnaether met KOH, (d. i.: het zoogenaamde skatolrood).

III.

Het eerst moest nu worden uitgemaakt, of dit Mg-praeparaat eene constante samenstelling had of niet, waartoe dus het gehalte aan Mg, C, H, en N moest worden bepaald. Bovendien is door mij een quantitatief onderzoek op S verricht en een kwalitatief op P (negatief).

Tot dat doel heb ik vijf verschillende praeparaten van c^a 1 gram bereid voor de bepaling van C, H, en N. Voor 1 gram praeparaat is 30 à 35 L. urine noodig. Deze praeparaten zal ik aanduiden met de letters A, B, C, D en E. Bovendien heb ik nog een praeparaat F bereid voor vergelijkende N-bepalingen volgens Dumas en Kjeldahl. Voor de S-bepaling heb ik vier verschillende praeparaten gebruikt en wel twee voor het quantitatief onderzoek op gepaard H_2SO_4 en twee voor het quantitatief onderzoek op het totale S-gehalte.

Zoowel voor deze als volgende bepalingen is de aangegeven gewichtshoeveelheid steeds die van eene bij 105 à 110° C. tot constant gewicht gedroogde hoeveelheid.

1. Mg-bepaling.

De stof werd in een platinakroes verbrand, de asch in HCl opgelost en overgebracht in een bekersglas, waarbij ik zorgde, dat de platinakroes goed werd nagespoeld met water en dat dit spoelwater eveneens in het

bekerglas werd overgebracht. Door NH_3 , $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ en Na_2HPO_4 werd het magnesium als $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$ neergeslagen. Dit praecipitaat werd na 24 uur afgefiltreerd op een aschvrij filter, daarna goed uitgewasschen met verdunde NH_3 -oplossing (1 dl. 10 % NH_3 op 3 dln. H_2O) en na droging met het filter in een gewogen platina-kroes verbrand en gegloeid tot constant gewicht. Het Magnesium werd dus op de gewone wijze als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ bepaald.

Van praeparaat A. gaf:

0,2472 gr.: 0,1219 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,02636$ gr. Mg = 10,66 %;

van praeparaat B:

0,3286 gr.: 0,1488 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,032173$ gr. Mg = 9,79 %.

(Evenwel mag deze bepaling niet in rekening worden gebracht, aangezien tijdens de weging van het gevormde $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ iets uit de kroes is gespat);

van praeparaat C:

0,1905 gr.: 0,0882 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,01907$ gr. Mg = 10,01 %;

van praeparaat D:

0,1947 gr.: 0,0911 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0197$ gr. Mg = 10,12 %;

van praeparaat E:

0,2447 gr.: 0,1160 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0251$ gr. Mg = 10,25 %.

2. Bepaling van C en H.

De stof werd in eene gesloten verbrandingsbuis verbrand met loodchromaat en ten slotte in een zuurstofstroom. Het gevormde water werd opgevangen in een gewogen buisje met CaCl_2 , het gevormde koolzuur in

twee gewogen buisjes, voor de eene helft gevuld met natronkalk en voor de andere helft met CaCl_2 .

Van praeparaat A gaf:

0,3283 gr.: 0,5613 gr. CO_2 = 0,15308 gr. C = 46,63 % en

0,1504 gr. H_2O = 0,01671 gr. H = 5,09 %;

van praeparaat B:

0,2722 gr.: 0,4651 gr. CO_2 = 0,12685 gr. C = 46,60 %
en 0,1233 gr. H_2O = 0,0137 gr. H = 5,03 %;

van praeparaat C:

0,2662 gr.: 0,4542 gr. CO_2 = 0,1238 gr. C = 46,53 % en

0,1154 gr. H_2O = 0,01282 gr. H = 4,82 %;

van praeparaat D:

0,2148 gr.: 0,3661 gr. CO_2 = 0,09985 gr. C = 46,48 % en

0,0951 gr. H_2O = 0,01056 gr. H = 4,92 %;

van praeparaat E:

0,2184 gr.: 0,3740 gr. CO_2 = 0,1020 gr. C = 46,70 % en

0,0995 gr. H_2O = 0,01105 gr. H = 5,06 %.

3. N-bepaling.

Van praeparaat A werd het N-gehalte volgens Kjeldahl bepaald. Aangezien evenwel zelfs na $2\frac{1}{2}$ à 3 uur destrueeren geen kleurloos product werd verkregen, heb ik, alvorens verder te gaan, van praeparaat F een paar vergelijkende bepalingen volgens Dumas en volgens Kjeldahl verricht. Het resultaat was, zooals uit onderstaande analyses blijkt, van dien aard, dat de overige bepalingen uitsluitend volgens Dumas zijn verricht en alleen de volgens deze methode verkregen resultaten in rekening zijn gebracht.

Ter bepaling volgens Kjeldahl werd de stof in een Kjeldahl-kolfje gedestruëerd met P_2O_5 -houdend H_2SO_4 (100 gr. P_2O_5 op 1 L. sterk H_2SO_4) en een druppel kwik. Het daarbij verkregen product werd opgelost in water, overgebracht in een distilleerkolf en na toevoeging van sterke KOH en van K_2S tot op de helft afgedistilleerd. De ontwijkende ammoniak werd opgevangen in eene afgemeten hoeveelheid $\frac{1}{4}$ N— H_2SO_4 en het niet geneutraliseerde H_2SO_4 door titreeren bepaald. (Indicator: methylooranje.)

Ter bepaling volgens Dumas werd de stof in eene CO_2 -atmosfeer verbrand met CuO en de ontwikkelde stikstof opgevangen in eene eudiometerbuis boven kwik en KOH. De eudiometerbuis werd overgebracht in gedistilleerd water en na afkoeling en gelijkstelling van het niveau binnen en buiten de buis de hoeveelheid N gemeten. Voor de berekening is het gewicht van 1 c.c. vochtige stikstof ontleend aan de tabel, voorkomende in: «Gattermann, die Praxis des organischen Chemikers».

Van praeparaat F:

a) (volgens Dumas) gaf:

0,3060 gr.: 10 c.c.N ($t = 18,3^\circ C.$, $h = 764$ mM. Hg.) = 11,595 mgr. N of 3,79 %;

0,2071 gr.: 6 c.c.N ($t = 23,3^\circ C.$, $h = 756$ mM. Hg.) = 6,7152 mgr. N of 3,26 %;

0,2233 gr.: 6,75 c.c.N ($t = 21,4^\circ C.$, $h = 759$ mM. Hg.) = 7,6747 mgr. N of 3,44 %;

0,3147 gr.: 9,5 c.c.N ($t = 21,4^\circ C.$, $h = 765$ mM. Hg.) = 10,865 mgr. N of 3,45 %;

b) (volgens Kjeldahl) neutraliseerde de ontwikkelde NH_3 van:

0,3724 gr.: 9,35 c.c. $\frac{1}{4}$ N— H_2SO_4 = 32,725 mgr. N of 8,78 %;

0,2386 gr.: 4,15 c.c. $\frac{1}{4}$ N—H₂SO₄ = 14,525 mgr. N of 6,09 %;

0,1773 gr.: 1,65 c.c. $\frac{1}{4}$ N—H₂SO₄ = 5,775 mgr. N of 3,26 %;

0,1884 gr.: 1,55 c.c. $\frac{1}{4}$ N—H₂SO₄ = 5,425 mgr. N of 2,88 %;

De oorzaak, waardoor deze resultaten, zoowel onderling als van die der Dumas-bepalingen van hetzelfde praeparaat, afwijken, heb ik niet kunnen ontdekken.

Van praeparaat A (volgens Kjeldahl) neutraliseerde de ontwikkelde NH₃ van 0,2799 gr: 2,25 c.c. $\frac{1}{4}$ N—H₂SO₄ = 7,875 mgr. N of 2,81 %.

Volgens Dumas gaf van praeparaat B:

0,3647 gr.: 10 $\frac{1}{4}$ c.c.N (t = 18,8°C., h = 768 mM. Hg.) = 11,9225 mgr. N of 3,269 %;

van praeparaat C:

0,4287 gr.: 12,5 c.c.N (t = 23,2°C., h = 766 mM. Hg.) = 14,187 mgr. N of 3,31%;

van praeparaat D:

0,3716 gr.: 10,5 c.c.N (t = 22,6°C., h = 769 mM. Hg.) = 12,0069 mgr. N of 3,23 %;

van praeparaat E:

0,3592 gr.: 9,5 c.c.N (t = 23° C., h = 769 mg. Hg.) = 10,8345 mgr. N of 3,016 %.

4. Bepaling van S.

a. *Gepaard zwavelzuur.* Overeenkomstig de voorschriften van Baumann ¹⁾ en Salkowski ²⁾ werd de stof gedurende 1 uur in HCl van 2 % op een goed kokend

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. I pag. 70: Ueber die Bestimmung der Schwefelsäure im Harn.

²⁾ Z. f. Physiol. Ch. X pag. 346: Ueber die quantitative Bestimmung der Schwefelsäure und Aetherschweifelsäure im Harn.

waterbad verhit. Nog warm werd eene warme oplossing van BaCl_2 in overmaat toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 24 uur rustig bleef staan. Na filtreren op een aschvrij filter en goed uitwasschen werd het filter met het praecipitaat in een gewogen platinakroes verbrand en daarna de gewichtsvermeerdering van den kroes bepaald.

Zoo vond ik, uitgaande van 0,2336 gr. eene gewichtsvermeerdering van den kroes van 0,8 mgr. (BaSO_4) of 0,15 mgr. S en

van 0,1731 gr. eene gewichtsvermeerdering van 0,6 mgr. (BaSO_4) of 0,11 mgr. S.

b. Totale hoeveelheid S. De stof werd gesmolten met een mengsel van KNO_3 en Na_2CO_3 , het residu met water uitgetrokken en deze waterige oplossing tot droog verdampt. Het residu werd opgelost in HCl en weer tot droog verdampt, hetgeen 4 à 5 maal werd herhaald. Ten slotte werd het residu in water opgelost en bij zwakzure reactie onder verwarming BaCl_2 toegevoegd. Na 24 uur werd dit verder behandeld als sub. a):

0,1435 gr. gaf: 1,1 mgr. BaSO_4 of 0,2 mgr. S.;

0,1917 gr. gaf: 4,5 mgr. BaSO_4 of 0,8 mgr. S.

Deze resultaten geven het recht de stof als zwavelvrij te beschouwen, temeer daar het gloeien op gas is geschied en in dat geval steeds sporen van zwavel worden gevonden.

Tot beter overzicht volgen hier de resultaten, bij de analyse verkregen, in eene tabel vereenigd:

Praeparaat.	Mg. %	C. %	H. %	N. %
A.	10,66	46,63	5,09	—
B.	—	46,60	5,03	3,269
C.	10,01	46,53	4,82	3,31
D.	10,12	46,48	4,92	3,23
E.	10,25	46,70	5,06	3,016
F.	—	—	—	3,79
»	—	—	—	3,26
»	—	—	—	3,44
»	—	—	—	3,45
Gemiddeld :	10,26	46,588	4,98	3,346

De cijfers hebben voldoende overeenstemming om het onderzochte praeparaat als constant van samenstelling te beschouwen.

IV.

Na deze, door de analyse, verkregen resultaten was het noodig, de samenstelling van deze stof op te sporen en vooral na te gaan, of in dit praeparaat skatol aanwezig was of op weinig ingrijpende manier daaruit kon worden bereid.

Ik heb eerst de stof aan droge distillatie in vacuo onderworpen. De stof werd met uitgegloeid zand vermengd en voorzichtig verwarmd in een graphietbad. Van 130°—210°C. gingen kleurlooze droppeltjes over. Deze reageerden sterk zuur en hadden den scherp prikkelenden geur van azijnzuur. Bij het hooger worden der temperatuur begonnen witte dampen over te gaan, die zich in den ontvanger condenseerden. Ten slotte bleef in het distilleerkolfje wat kool over.

Het verkregen distillaat was oplosbaar in alcohol en rook naar benzaldehyd. Voegde men bij de alcoholische oplossing van het distillaat eene alcoholische oplossing van symm. trinitrobenzol, dan gelukte het niet hierdoor een rood kristallijn praecipitaat te verkrijgen. Zooals v. Romburgh ¹⁾ heeft aangetoond, geeft eene alcoholische oplossing van skatol met eene alcoholische oplossing van symm. trinitrobenzol na eenige oogenblikken een bijna quantitatief praecipitaat van symm. trinitrobenzol-skatol in roode naalden met smeltpunt 183°C.

¹⁾ Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas et de la Belgique XIV pag. 65: Sur quelques combinaisons du trinitrobenzène symétrique.

Bij toevoeging van phenylhydrazine en ijszijn aan de alcoholische oplossing van het distillaat ontstond een praecipitaat, dat bij verdunning met water bleef bestaan (aldehyd of ketongroep.)

Bij deze droge distillatie was dus een vluchtig zuur overgegaan. Het was dus wenschelijk te onderzoeken, welk zuur dit was en, zoo mogelijk, dit tevens quantitief te bepalen.

Daartoe wordt 2,1026 gr. van het Mg-paeparaat opgelost in water en hieraan voldoende zwavelzuur toegevoegd om het Magnesium uit zijne verbinding uit te drijven en bovendien nog eene kleine overmaat te hebben (ca 20 c.c. norm. H_2SO_4). Onder herhaalde toevoeging van water wordt deze oplossing zoolang aan distillatie onderworpen, tot met het distillaat geen zuur meer overgaat. Het kleurloze distillaat vereischt ter neutralisatie 134,4 c.c. 0,0971 N-NaOH. Hierna wordt het geneutraliseerde distillaat tot een klein volumen ingedampt en vermengd met eene geconcentreerde oplossing van c 2,5 gr. AgNO_3 . Hg. waardoor een volumineus wit praecipitaat ontstaat. Door verwarming is geen volkomen oplossing te krijgen, daar zich dan een zwart neerslag vormt. De oplossing wordt hierna warm gefiltreerd en het filtraat scheidt dan na afkoeling witte kristallen uit. Deze worden van de moederloog afgefiltreerd, omgekristalliseerd, wederom van de moederloog afgefiltreerd en beide moederloogen vereenigd en ingedampt tot een tweede kristallisatie. Van dit zilverzout wordt het zilveragehalte bepaald door gloeiing en weging van het zilver:

a) 39,8 mgr. gaf 25,6 mgr. Ag = 64,32 %;

b) 96,3 mgr. gaf 62,3 mgr. Ag = 64,69 %.

De overeenstemming met het zilveragehalte van zilver-

acetaat (64,67 %) is voldoende om de kristallen als zilveracetaat te beschouwen.

Nadat de moederloog en het bovengenoemde zwarte praecipitaat door HCl van het zilver waren bevrijd, werden beide hierdoor verkregen oplossingen ingedampt en bleek, dat zij niets achterlieten. Men moet dus aannemen, dat het geheele distillaat uit azijnzuur bestond, waarvan dus de hoeveelheid 782,38 mgr. bedroeg, beantwoordende aan de 134,4 c.c. 0,0971 N—NaOH, ter neutralisatie vereischt. Het gevonden azijnzuur is derhalve 37,21 % van de gebruikte hoeveelheid van het Mg-paeparaat.

Toch was de opbrengst aan zilveracetaat, uit deze hoeveelheid azijnzuur verkregen, gering, vergeleken bij de hoeveelheid zilveracetaat, die ik, ter vergelijking, uit 0,5 gr. zuiver azijnzuur kon bereiden. Wanneer men echter de hierbij verkregen kristal massa weer in hare moederloog door verwarming oploste onder toevoeging van een paar druppels van het 10-maal verdunde bruine residu, dat na de distillatie was overgebleven, zag men deze oplossing eveneens zwart worden en bleek de hoeveelheid uitkristalliseerend zilveracetaat belangrijk verminderd. Bij het distilleeren moeten dus sporen van deze bruine stof met den waterdamp zijn overgevoerd.

Dit, na de distillatie overgebleven, residu werd gedurende een paar dagen in een exsiccator weggezet. Er zetten zich dan bruingekleurde kristallen af, die door afwasschen met alcohol of aceton en omkristalliseeren uit water konden worden gezuiverd. De hierdoor verkregen naaldvormige kleurloze kristallen losten moeilijk in koud water, gemakkelijk in warm water op. Ook waren zij goed oplosbaar in warmen

alkohol. De oplossing reageert sterk zuur. Zij smolten bij 187°C . onder bruinkleuring.

Wanneer men de kristallen met Na smolt in een glazen buisje, dit in water bracht, het water affilteerde van de glasscherven enz. en hieraan FeSO_4 en HCl toevoegde, ontstond een praecipitaat van Berlijnsch blauw. Zij bevatten dus stikstof. Van de bekende stikstofhoudende zuren smelt

hippuurzuur bij 187°C .;

paramidobenzoëzuur bij 186°C .

Bepaalde men het smeltpunt van een mengsel van het gevonden zuur en hippuurzuur, dan bleef dit 187°C . Een mengsel van het gevonden zuur en paramidobenzoëzuur smolt reeds bij 150°C . onder gasontwikkeling. Het gevonden zuur was dus hippuurzuur. Ter nadere bevestiging volge hier nog

a) eene stikstofbepaling:

0,1983 gr. gaf 13,6 c. c. N ($t = 6^{\circ}\text{C}$., $h = 748$ mM. Hg.) = 15,947 mgr. N of 8,04 %. Hippuurzuur bevat 7,82 % N.

b) eene bepaling der aciditeit:

41,9 mgr. vereischte ter neutralisatie 2,4 c. c. 0,0971 N-NaOH. Teruggevonden werd dus 41,71 mgr. hippuurzuur.

Het Mg-praeparaat bevatte dus, behalve het chromogeen, nog hippuurzuur en azijnzuur. Er moest derhalve worden nagegaan, of dit chromogeen niet zonder de bijmenging van deze zuren kon worden verkregen. Daartoe werd de van indican bevrijde azijnaether, waaruit ook het Mg-praeparaat werd bereid, grootendeels afgedistilleerd. Uit het bruine chromogeenhoudend residu zetten zich bij afkoeling hippuurzuurkristallen af. Dit residu werd van de kristallen afgeschonken en

bleef aan de lucht staan om den azijnaether verder te laten verdampen. Hierbij zetten zich nog meer hippuurzuurkristallen af. Door afwasschen met kouden azijnaether en weer verdampen gelukte het ten slotte eene bruine stroop te verkrijgen, die zoogoed als geen hippuurzuur meer bevatte. Het was niet mogelijk deze stroperige massa in vasten vorm te verkrijgen. Zelfs na wekenlang verblijf in een exsiccator bleef het eene min of meer dikke stroop. Het leek mij niet van belang ontbloot nog eens te onderzoeken, of nu soms zwavelzuur kon worden aangetoond. Daartoe werd de hoeveelheid bruine stof uit c^a 30 L. urine in ongeveer 30 c.c. kokend water opgelost. Deze oplossing was volkomen helder. Bij afkoeling scheidde zich een gedeelte der bruine stroperige massa weer af. Toevoeging van warme BaCl_2 -oplossing aan de warme oplossing gaf *geene* troebelheid. Toch werd voor volkomen zekerheid dit mengsel warm gefiltreerd en daarna het filtraat, na toevoeging van zooveel HCl , dat het gehalte 1 % bedroeg, gedurende een uur verhit. Nog warm zijnde, werd de oplossing gefiltreerd, het filter in een platina-kroes verbrand en na gloeiing van den kroes de eventuele inhoud met (sulfaatvrij) K_2CO_3 gesmolten in de blaasvlam. Na afkoeling werd de inhoud van den kroes met water uitgetrokken, de oplossing van de rest afgefiltreerd en aan het filtraat BaCl_2 en een weinig HCl toegevoegd. Er ontstond eene geringe (echter onweegbare) troebelheid. Ter controle werd een filter, van dezelfde soort als boven, eveneens in een platina-kroes verbrand, de rest met K_2CO_3 gesmolten enz. en nu bleek in dit geval eveneens na de toevoeging van het BaCl_2 eene lichte onweegbare troebelheid te ontstaan.

Uit dit onderzoek en het onderzoek op gepaard zwavelzuur van het Mg-paeparaat blijkt dus, dat het onderzochte chromogeen *niet* als gepaard zwavelzuur voorkomt.

Een onderzoek naar de mogelijkheid, dat het een gepaard glycuronzuur zou zijn, gaf eveneens een negatief resultaat. Na 1 uur koken met 1 à 2 % HCl bleek eene oplossing van het chromogeen Fehling's proefvocht niet te reduceeren.

Vervolgens heb ik een onderzoek ingesteld, of skatol in de stof was aan te toonen.

Het bruingekeurde filtraat, dat bij de vooraafgaande bepaling op H_2SO_4 na de toevoeging van het chloorbaryum was verkregen, en dat met HCl en KNO_3 de kleurreactie nog goed gaf en dus het chromogeen nog bevatte, werd in twee helften verdeeld. Aan de eene helft werd NaOH tot sterk alkalische reactie en zinkstof toegevoegd, aan de andere helft H_2SO_4 en zinkstof. Beide vloeistoffen werden aan distillatie onderworpen. Na afloop der distillatie gaven beide vloeistoffen de kleurreactie nog even schitterend. De kleurlooze distillaten werden met aether uitgeschud; de aether afgedistilleerd, het residu (minimaal!) in alkohol opgelost en met eene alkoholische oplossing van symm. trinitrobenzol behandeld: geen skatol was aanwezig (noch indol). De afgedistilleerde bruine vloeistoffen werden eveneens met aether uitgeschud; de aether afgedistilleerd; het residu (eveneens minimaal), na oplossing in alkohol, ook met trinitrobenzol behandeld: geen skatol of indol. Ook na het uitschudden met aether gaf de bruine vloeistof nog de kleurreactie.

Distillatie van de bruine stroop in alkalische of zure

oplossing, zonder gelijktijdige reductie, gaf eveneens negatief resultaat.

Het was dus niet mogelijk langs dezen weg skatol of indol uit het chromogeen te verkrijgen. Er bleef nog over na te gaan, of de stof onder invloed van bacteriën skatol of indol kon leveren.

Om de vereischte bacteriën te krijgen werd eene gelatinecultuur van tuinaarde gemaakt onder toevoeging van $\frac{1}{40}$ % K_2HPO_4 aan het tot op $\frac{1}{10}$ vol. ingedamppte waterleidingwater, dat voor de cultuur werd gebruikt ¹⁾. Na een paar dagen verblijf in de broedstoof bij 40° C. werden met de gekweekte bacteriën drie cultures aangelegd:

- a) eene nieuwe gelatinecultuur ter controle.
- b) eene peptoncultuur, waarin dus de gelatine van de eerste cultuur door pepton was vervangen. Na 2 à 3 dagen gaf deze cultuur de nitrosoindolreactie, hetgeen in de gelatinecultuur natuurlijk niet geschiedde.

c) eene gelatinecultuur als sub a, waaraan het chromogeen was toegevoegd. Reactie der cultures: zwak alkalisch.

Na 6 à 8 dagen geeft cultuur c bij behandeling met HCl en KNO_3 geene kleurreactie meer. Zij geeft evenmin de reactie met glyoxylzuur (reactie van Adamkiewicz). Bij distillatie der cultuur bij alkalische reactie (NaOH) kon in het distillaat op de reeds genoemde wijze geen skatol of indol worden aangetoond. De afgedistilleerde cultuur wordt met aether uitgeschud (bij zure en bij alkalische reactie) en dit aetherisch extract eveneens op skatol onderzocht: negatief. Ten bewijze, dat onder invloed der bacteriën de stof wel veranderd was, zij hier vermeld, dat thans bij uitschudden

¹⁾ Deze voedingsbodem werd aangeraden door Prof. Beyerinck te Delft.

met aether, zoowel bij alkalische als bij zure reactie, bruine stof in den aether overging, hetgeen voor de werking der bacteriën nooit geschiedde. Ook heb ik nog eene cultuur gemaakt uit het chromogeen, waaraan alleen water en K_2HPO_4 was toegevoegd. In dit geval bleef de cultuur zelfs na 3 à 4 weken nog de kleurreactie geven en scheen het wel, dat de bacteriën afstierven.

Wanneer men nu in aanmerking neemt, dat de bekende skatolderivaten (waarvan alléén het skatolcarbonzuur eene bestendige roode kleurstof levert), zoo gemakkelijk skatol afgeven (skatolcarbonzuur en skatolazijnzuur doen dit reeds bij verhitting boven het smeltpunt) en tevens, dat het mij niet mogelijk was uit de onderzochte stof, hetzij door sublimatie, hetzij door reductie en distillatie, hetzij door werking van bacteriën een spoor van skatol resp. indol te verkrijgen, dan is de conclusie zeker niet gewaagd, dat dit chromogeen hoogstwaarschijnlijk geen skatolderivaat is.

Opmerkelijk is echter de overeenkomst tusschen de uit deze stof te verkrijgen kleurstof en de uroroseïne van Nencki en Sieber ¹⁾. Zooals bekend is, bereidden Nencki en Sieber de uroroseïne door aan de urine een mineraalzuur toe te voegen, waardoor binnen 1 à 3 minuten de kleurstof ontstaat. Hoewel zij geen oxydeerend middel toevoegden, konden zij toch de medewerking van de in de urine aanwezige nitrieten niet buitensluiten, zoodat deze bereiding geen verschil oplevert met die van het z. g. skatolrood. Als eigenschappen geven zij op:

1. De kleurstof lost met roode kleur op in water,

¹⁾ Journ. f. pr. Chemie N. F. XXVI pag. 333: Ueber das Urorosein.

aethyl- en amylalkohol, moeilijk in azijnaether. Aether, chloroform, benzol, zwavelkoolstof onttrekken de kleurstof niet aan de waterige oplossing.

2. De alcoholische oplossing geeft eene absorptiestreep in het begin van het groen tusschen D en E, verder eene verduistering van het violette gedeelte van het spektrum. Zij constateeren ook wel eene zwakke tweede streep aan het eind van het groen, doch schrijven die toe aan een spoor van urobiline.

3. Alkaliën veranderen de roode kleur in bruin; door zuren verschijnt de roode kleur terug. Zinkstof in zure oplossing ontkleurt de roode vloeistof; bij staan aan de lucht keert de roode kleur terug.

4. De oplossing kleurt wol, waarop zij door natriumacetaat in overmaat zoodanig gehecht wordt, dat zij slechts door koken met H_2SO_4 -houdenden alkohol weer in oplossing komt.

Een dergelijk onderzoek, door mij ingesteld met de z. g. skatolkleurstof, gaf dezelfde resultaten.

Het eenige punt van verschil is de bestendigheid van de kleurstof. Nencki en Sieber geven aan, dat de roode kleur van urines, welke door toevoeging van HCl prachtig rose zijn, na eenige uren reeds verdwijnt en dat bij het verdampen der waterige en alcoholische oplossingen de kleurstof als bruine harsdruppels overblijft. Het z. g. skatolrood (in niet verontreinigde oplossing) daarentegen is zeer bestendig. Ik heb eene zure oplossing van de kleurstof meer dan $1\frac{1}{2}$ jaar bewaard, zonder dat iets van de roode kleur verdween.

Vermengt men echter eene donkerrood gekleurde oplossing van de kleurstof met urine, dan blijkt $c^{\frac{1}{5}}$ vol. noodig te zijn, voordat de urine eene roode tint krijgt. De gele kleurstof der urine bedekt dus blijkbaar

de roode kleur. Na eenige uren wordt de kleur weer minder duidelijk. Het is dus niet onwaarschijnlijk, dat de onbestendigheid van de uroroseïne op eigenschappen der urine berust. En door deze eigenschappen komt het misschien ook, dat Nencki en Sieber hunne kleurstof alleen uit pathologische urine hebben verkregen. Een mogelijk grooter gehalte van de pathologische urine aan nitrieten, gaf misschien dan gelegenheid zooveel kleurstof te vormen, dat zij, niettegenstaande de gele urinekleur, zichtbaar werd. Overigens stemt de bereiding geheel overeen met de bereiding van het z. g. skatolrood, zooals zij steeds werd opgegeven. Brieger, Mester, Otto geven eveneens aan, dat zij hunne kleurstof uit urine bereiden door koken met HCl; Brieger bereidt zelfs de kleurstof op die wijze uit zijn kristallen van »skatoxylzwavelzure kali». En wanneer men nu bedenkt, dat, zoowel uit de bekende skatolderivaten als uit het door mij onderzochte chromogeen, alleen kleurstof is te bereiden door gelijktijdige toevoeging van een oxydeerend middel, dan moet men besluiten, dat zij ook bij hunne bereidingswijze onbewust hebben gebruikt gemaakt van in de urine aanwezige oxydeerende stoffen. Evenmin is het dus onwaarschijnlijk, dat bij de vorming van de uroroseïne dergelijke stoffen medewerkten. Er blijkt dan eene zoodanige overeenstemming te bestaan tusschen het z. g. skatolrood en de uroroseïne, dat het niet gewaagd is beide kleurstoffen identisch te verklaren. En al is uroroseïne voorloopig niet meer dan een naam, toch heeft deze identificatie tengevolge, dat het aantal roode kleurstoffen met ééne wordt verminderd.

Het spreekt vanzelf, dat naast dit chromogeen in urine nog skatolderivaten kunnen voorkomen. Maar zij

zijn in normale urine niet aan te merken als het chromogeen van het z. g. skatolrood, daar dit m. i. geen skatolderivaat is. De naam skatolrood mag dus zeker niet letterlijk worden opgevat, wanneer men de zóógenoemde kleurstof uit normale urine bedoelt. De door Salkowski e. a. uit skatolcarbonzuur bereide roode kleurstof draagt natuurlijk terecht dezen naam.

V.

Het leek mij niet onmogelijk, dat langs indirecten weg misschien nog iets omtrent de samenstelling van het chromogeen zou te vinden zijn. Het door mij onderzochte Mg-praeparaat was van constante samenstelling; misschien dat een quantitative bepaling van de daarin voorkomende zuren tot eenig resultaat zou leiden. Zooals uit een vorig hoofdstuk blijkt, had ééne azijnzuurbepaling een gehalte van 37,21 % opgeleverd.

Ik heb nog twee azijnzuurbepalingen gemaakt en eveneens twee hippuurzuurbepalingen.

I. Op de in hoofdstuk IV beschreven wijze werd uit 1,0139 gr. van het Mg-praeparaat het azijnzuur vrijgemaakt en afgedistilleerd. Het distillaat vereischte ter neutralisatie: 67,4 c.c. 0.95 N—NaOH = 384,18 mgr. azijnzuur of 37,89 %.

Het residu werd gebruikt om het hippuurzuur in den vorm van benzoëzuur te bepalen. Na neutralisatie van het residu heb ik het hippuurzuur hieruit geprecipiteerd door $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, zorg dragende, dat de reactie neutraal bleef. Het praecipitaat werd afgëfiltreerd en uitgewasschen en door H_2SO_4 (met gelijk vol. water verdund) weer tot oplossing gebracht. Ter controle werd eene hoeveelheid hippuurzuur (0,4098 gr.) op dezelfde wijze behandeld. Deze beide oplossingen werden gedurende 15 uren gekookt in kolven met omgekeerde koelbuis, om het hippuurzuur te splitsen in

benzoëzuur en glyocol ¹⁾. Na afloop werden de oplossingen uitgeschud met aether en van deze aetherische oplossingen de aether afgedistilleerd. Tot mijne verrassing verkreeg ik op deze wijze, zoowel uit het Mg-praeparaat als uit het hippuurzuur, slechts sporen van benzoëzuur.

II. Om mij te vergewissen van de betrouwbaarheid voor quantitatief onderzoek van eene methode, door Beilstein ²⁾ aangegeven, ter bereiding van benzoëzuur uit hippuurzuur, heb ik, volgens diens voorschrift, hippuurzuur gedurende $\frac{1}{4}$ uur met rookend HCl laten koken in een kolf met omgekeerde koelbuis. Na afkoeling scheidde zich het benzoëzuur in kristallen uit. Daarna werd het zoutzuur met de benzoëzuurkristallen met aether uitgeschud en in een korthalzig wijdmondsch kolfje van deze aetherische oplossing de aether afgedistilleerd, terwijl ten slotte gezorgd werd, dat het uitkristalliseerende benzoëzuur zich in eene dunne laag over de binnenoppervlakte van het kolfje afzette.

Dit kolfje met benzoëzuur bleef aldus 2 dagen bij kamertemperatuur (28 à 30°C.) staan om de sporen HCl, die in den aether waren overgegaan, te laten verdampen. Daarna werd het benzoëzuur door titreeren bepaald. Eene smeltpuntbepaling (120°C.) leverde het bewijs, dat het gevormde zuur werkelijk benzoëzuur was. Toch bleek niet alle hippuurzuur te zijn ontleed, want na het uitschudden met aether bleven in het zoutzuur hippuurzuurkristallen achter. Op deze wijze behandeld, gaf:

0,4404 gr. hippuurzuur eene hoeveelheid benzoëzuur,

¹⁾ Schmidt, Pharm. Chem. II, 1 pag. 354.

²⁾ Handb. d. org. Chemie. II pag. 1136.

die ter neutralisatie 10 c.c. 0,2188 N—NaOH vereischte, beantwoordende aan 259,62 mgr. benzoëzuur of 86,49 % van de berekende hoeveelheid.

Twee volgende bepalingen, waarbij het hippuurzuur echter $\frac{3}{4}$ uur met rookend HCl werd gekookt, gaven betere resultaten. Na het uitschudden met aether bleven geene hippuurzuurkristallen achter.

0,4129 gr. hippuurzuur gaf 264,807 mgr. benzoëzuur of 94,11 % van de berekende hoeveelheid. (Ter neutralisatie werden vereischt: 10,2 c.c. 0,2128 N—NaOH).

0,4167 gr. hippuurzuur gaf 270 mgr. benzoëzuur of 95,65 % van de berekende hoeveelheid. (Ter neutralisatie werden vereischt: 10,4 c.c. 0,2128 N—NaOH.).

Gemiddeld derhalve: 94,58 %.

III. Op dezelfde wijze werd het hippuurzuur uit het Mg-paeparaat bepaald, (dus zonder voorafgaande praecipitatie met $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$):

Van 1,0518 gr. Mg-paeparaat vereischte het gevormde benzoëzuur ter neutralisatie: 8,4 c.c. 0,2128 N—NaOH, d.i.: 218,075 mgr. benzoëzuur, beantwoordende aan 319,96 mgr. hippuurzuur of 30,42 %.

IV. Van het volgende paeparaat werd zoowel het azijnzuur- als het hippuurzuurgehalte bepaald:

0,6702 gr. Mg-paeparaat: Het azijnzuurdistillaat vereischte ter neutralisatie 19,8 c.c. 0,2128 N—NaOH, d.i.: 252,806 mgr. azijnzuur of 37,72 %.

Het na de distillatie overgebleven residu werd eerst geneutraliseerd en ingedampt en daarna met HCl gekookt, enz. Het gevormde benzoëzuur vereischte ter neutralisatie: 5,3 c.c. 0,2128 N—NaOH; dus 137,59 mgr. benzoëzuur d.i.: 201,88 mgr. hippuurzuur of 30,42 %.

Er is dus gevonden aan :

Aziijnzuur :	Hippuurzuur :
37,21 %.	—
37,89 %.	—
—	30,42 %.
37,72 %.	30,42 %.

dus gemiddeld:

azijnzuur : 37,61 % en

hippuurzuur : 30,27 %. (gecorrigeerd: 32,004 %).

In 1 gr. Mg-praeparaat komt dus voor : 376,1 mgr. azijnzuur en *als minimum* 302,7 mgr. hippuurzuur. Eene eenvoudige berekening leert, dat door deze hoeveelheden resp. 75,22 en 21,45 mgr. Mg worden gebonden tot 445,05 mgr. magnesiumacetaat en 339,71 mgr. magnesiumhippuraat. Daar volgens de analyse (zie hoofdst. III) 1 gr. van het praeparaat 102,6 mgr. Mg moet bevatten, zouden nog 5,93 mgr. Mg overblijven, die volgens de uitkomsten van deze bepaling niet door deze zuren waren gebonden. Deze hoeveelheid is zóó binnen de grenzen der fouten, die aan deze zuurbepalingen verbonden zijn, dat zij niet toelaat eenige conclusie te trekken omtrent een eventueel zuur karakter van het chromogeen. Zoo staat het ook met de hoeveelheid N: In het hippuurzuur van 1 gr. praeparaat is 25,032 mgr. N, terwijl het totale N-gehalte van 1 gr. praeparaat volgens analyse 33,46 mgr. bedraagt: 8,43 mgr. N zouden dus een anderen oorsprong moeten hebben.

De hoeveelheid chromogeen, in 1 gr. praeparaat aanwezig, (dus na aftrek van het magnesiumacetaat en magnesiumhippuraat), bedraagt: 215,24 mgr. Het is dus niet waarschijnlijk, dat het beschikbare Mg daaraan zou zijn gebonden: deze hoeveelheid bedraagt

slechts 2,755 % van de hoeveelheid chromogeen. Bovendien is niet de geheele hoeveelheid van 5,93 mgr. Mg beschikbaar, want de hoeveelheid hippuurzuur is zeker grooter dan 30,27 %. Denkt men zich de geheele hoeveelheid van 5,93 mgr. Mg aan hippuurzuur gebonden, dan blijft voor het chromogeen geen N beschikbaar: Immers de hoeveelheid N van eene aan 5,93 mgr. Mg gebonden hoeveelheid hippuurzuur bedraagt 6,92 mgr. De rest (1,51 mgr.) valt zeker binnen de grenzen van de aan de bepaling verbonden fouten.

In ieder geval zijn de resultaten van deze bepalingen van dien aard, dat zij zelfs omtrent de kwalitatieve samenstelling van het chromogeen geen licht verschaffen.

Het blijft evenwel een opmerkelijk verschijnsel, dat het praeparaat blijkbaar naast dezelfde relatieve hoeveelheden hippuurzuur en azijnzuur steeds dezelfde hoeveelheid chromogeen bevat, terwijl het praeparaat steeds in zijn geheel oplosbaar of onoplosbaar is in verschillende oplossingsmiddelen. Het is mij nooit gelukt het praeparaat door oplossingsmiddelen in zijne bestanddeelen te scheiden.

VI.

Ten slotte nog een enkel woord over de methode van Stokvis. In een enkel geval heb ik, om spoedig eene groote hoeveelheid chromogeen beschikbaar te hebben, gebruik gemaakt van paardenurine. Deze bevatte, zooals ik natuurlijk ook verwachtte, groote hoeveelheden skatolroodchromogeen. In plaats van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebruikte ik toen basisch loodacetaat, omdat de urine zich, na gebruik van dit zout, aangenamer laat behandelen, dan bij gebruik van ammoniumsulfaat. Tot mijne verwondering echter verkreeg ik uit den azijnaether bijna geen chromogeen en tevens zoo goed als geen hippuurzuur. Dit was dan ook grootendeels als loodzout neergeslagen. De uitgeschudde urine daarentegen bleek nog eene zeer sterke skatolroodreactie te geven!

Daarna paardenurine met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ behandelend, verkreeg ik eene zeer rijke opbrengst aan chromogeen en hippuurzuur. In verband met het feit, dat de hippuurzuurkristallen zeer moeilijk van het chromogeen zijn te zuiveren, moet men wel aannemen, dat de methode van Stokvis berust op de bekende eigenschap van hippuurzuur kleurstoffen mee te sleepen. Misschien bevordert ook de saturatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ den overgang van het chromogeen in den azijnaether.

Zoo is het ook duidelijk, dat de opbrengst van chromogeen volgens de methode van Steensma zooveel minder is dan volgens die van Stokvis. (Zie hoofdst. II).

CONCLUSIES.

I.

Het chromogeen van het z.g. skatolrood in normale menselijke urine is *geen* gepaard zwavelzuur.

Het onderzoek naar zwavelzuur (zie hoofdst. III en IV) heft hieromtrent allen twijfel op.

II.

Dit chromogeen is *geen* skatolderivaat.

De resultaten, verkregen bij de pogingen om uit het chromogeen skatol, resp. indol te verkrijgen, (zie hoofdst. IV.), geven aan deze conclusie eene zoo hooge mate van waarschijnlijkheid, dat ik niet aarzel de conclusie aldus te formuleeren.

III.

Het z.g. skatolrood is identisch met uroroseïne.

De overeenstemming der eigenschappen (zie hoofdst. IV.) moet tot deze conclusie leiden.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

In de normale urine komen geene skatolderivaten voor.

II.

Bij de bepaling van het indoxyl uit urine volgens Wang-Obermayer mag de kleurstofhoudende chloroform niet met aether-alkohol-water worden uitgewasschen.

III.

De als phosphaturie bekende anomalie draagt een verkeerden naam; deze moet zijn: calciurie.

IV.

Paterson beweert ten onrechte, dat aan de wijze, waarop de beenkernen in het sternum ontstaan, geene morphologische beteekenis mag worden toegekend.

V.

Dienst tracht het ontstaan van eclampsia gravidarum te verklaren door het coïncideeren van een »niet dicht zijn" der placenta met biologische heterogeniteit van het moederlijke en het foetale bloed.

Dit is onjuist.

VI.

De brekingsindex van de lens neemt van de peripherie naar de kern niet gelijkmatig toe.

VII.

Het ontstaan van tractiedivertikels van den oesophagus berust op eene congenitale anomalie.

VIII.

Syphilis is eene chronische spirillose.

IX.

De ontwikkeling van den uterus heeft, in tegenstelling met die der ovariën, geen invloed op de ontwikkeling der mammae.

X.

De ziekte van Banti bestaat niet.

XI.

Het net van Golgi (volgens de nomenclatuur van Bethe) bevat, als het geen kunstprodukt is, evenwel geene zenuwfibrillen.

XII.

Voor ruggemergsanaesthesie gebruike men liever stovaïne dan cocaïne.

XIII.

Het positief uitvallen der reactie van Uffelmann bewijst de aanwezigheid van melkzuur niet met zekerheid.

XIV.

Er bestaat een congenitale vorm van coxa vara.

XV.

Voor het steriliseeren van melk gebruike men de methode van v. Budde.

XVI.

Bij koudbloedige dieren is de temperatuur van het hart zonder invloed op de prikkelbaarheid van den N. vagus.

XVII.

Syringomyelie ontstaat uit haematomyelie.

XVIII.

De methode van Schultze is, al wordt zij lege artis toegepast, niet zonder gevaar voor den neonatus.

NASCHRIFT.

Terwijl dit proefschrift ter perse was, verscheen nog eene mededeeling van Porcher en Hervieux, ¹⁾ die een uitvoerig verslag bevatte van de reeds in de Comptes rendus à l'Académie des Sciences voorloopig gepubliceerde onderzoeken. (Zie pag. 17.)

Na toediening (per os) van skatol aan dieren, wier urine door melkdiëet zoo goed als indicanvrij was, verkregen zij uit die urine door HCl eene roode kleurstof, tot wier bereiding zij slechts bij uitzondering een oxydatiemiddel (H_2O_2) gebruikten. Na langeren tijd staan, slaat de kleurstof gedeeltelijk als roode vlokken neer. Zij is onoplosbaar in aether, petroleum-aether, benzol, zwavelkoolstof en chloroform, terwijl amylalkohol het beste oplossingsmiddel is. Eene duidelijke roode urine verbleekt door toevoeging van NaOH (tot alkalische reactie) geheel, maar toevoeging van HCl doet de urine weer rood worden. Zij achten het mogelijk, dat het skatol in het organisme in een kleurloos zout overgaat, waaruit door HCl een roodgekleurd zuur wordt vrijgemaakt.

Eene oplossing der neergeslagen roode vlokken in amylalkohol verbleekt nooit geheel door NaOH.

¹⁾ Z. f. Physiol. Ch. XLV pag. 486: Untersuchungen über Skatol.

Door reductie wordt de kleurstof ontkleurd, terwijl voorzichtige oxydatie de roode kleur weer doet verschijnen.

Naast het skatolrood vonden zij geen indican in deze urines (afgezien van het spoor van indican, dat de urines voor de toediening van het skatol bevatten): In het organisme gaat dus skatol niet in indoxyl over. (cf. Maillard, — pag 17.)

Spektroskopisch vertoont eene gereinigde oplossing der kleurstof eene streep rechts van de natriumlijn ¹⁾, terwijl het rechter gedeelte van het spektrum meer of minder sterk verduisterd is, naar mate de kleurstof-oplossing meer of minder geconcentreerd is. In minder gereinigde oplossing vertoont zich links van de eerste streep nog een tweede, wier duidelijkheid zeer verschillend is.

Zij nemen de identiteit van deze kleurstof met uro-roseine aan, en vermoeden, dat andere roode urine-kleurstoffen n.l. die van Plosz, Golding Bird, Harley, Giacosa, Brieger, Mester, Otto, Grosser verontreinigde kleurstoffen zijn, die een gelijken oorsprong hebben.

Het lijdt wel geen twijfel, dat dit skatolrood van Porcher en Hervieux dezelfde kleurstof is als de door mij onderzochte. En aan het verband tusschen deze kleurstof en de toediening van skatol mag na dit onderzoek wel niet worden getwijfeld, al moet men dan ook aannemen dat noch de kleurstof, noch haar chromogeen skatolverbindingen zijn.

Doordat zij de kleurstof uit urine bereiden, hebben

¹⁾ In den tekst staat: links. Dit is natuurlijk, zooals uit de nadere definiëring van de streep blijkt, een lapsus calami.

zij geen oxydatiemiddel noodig. Eene oplossing van het chromogeen, zonder alle verontreinigingen, die in urine voorkomen, waarover ik, dank zij de methode van Stokvis, kon beschikken, bewijst de noodzakelijkheid van een oxydatiemiddel en derhalve ook, dat de kleurstof niet eenvoudig een uit zijn zout vrijgemaakt roodgekleurd zuur is.

The first part of the paper is devoted to a general
discussion of the problem of the origin of life.
The author discusses the various theories which have
been advanced to explain the origin of life, and
concludes that the most probable theory is that
life originated in the sea.

The second part of the paper is devoted to a
discussion of the problem of the evolution of life.
The author discusses the various theories which have
been advanced to explain the evolution of life, and
concludes that the most probable theory is that
life evolved from simple organic compounds.

The third part of the paper is devoted to a
discussion of the problem of the development of life.
The author discusses the various theories which have
been advanced to explain the development of life, and
concludes that the most probable theory is that
life developed from simple organic compounds.

The fourth part of the paper is devoted to a
discussion of the problem of the future of life.
The author discusses the various theories which have
been advanced to explain the future of life, and
concludes that the most probable theory is that
life will continue to evolve.

The fifth part of the paper is devoted to a
discussion of the problem of the origin of man.
The author discusses the various theories which have
been advanced to explain the origin of man, and
concludes that the most probable theory is that
man originated in the sea.

