

Zur Kenntniss der Indigo bildenden Substanzen im Harn.

2. Mittheilung.

Von

Georg Hoppe-Seyler.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts der Universität zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 22. August 1883.)

Im Anschluss an meine in dieser Zeitschrift veröffentlichten Versuche¹⁾ mit Orthonitrophenylpropionsäure habe ich weitere Untersuchungen über die Indigo bildenden Substanzen im Harn gemacht, wie ich es am Ende meiner ersten Mittheilung angekündigt hatte.

Zunächst schien es mir von Interesse zu untersuchen, ob das indoxylschwefelsaure Kalium auch aus normalem Harn nach der modificirten Methode von Baumann und Brieger, welche ich daselbst beschrieben habe, darzustellen sei. Ich verwandte dazu 25 Liter normalen Hundeharn. Es gelang mir dem auch, nach einigem Unkrystallisiren aus dem ätherisch-alkoholischen Extrakt des zum Syrup eingedampften, von Harnstoff dann möglichst befreiten Harns einige Gramm krystallisirtes indoxylschwefelsaures Kalium zu isoliren, das zwar nicht ganz rein war, aber in seinen Reaktionen und sonstigen Eigenschaften mit demjenigen, welches aus dem Harn nach Eingabe von Indol oder Orthonitrophenylpropionsäure dargestellt war, übereinstimmte. Es ist somit die im normalen Hundeharn stets vorhandene Substanz, die mit Salzsäure und Chlor Indigo bildet, nichts anderes, als das von Baumann und Brieger entdeckte indoxylschwefelsaure Kalium, wie es von vornherein zu vermuthen war.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 403.

Aus der alkoholisch-ätherischen Lösung, aus welcher das indoxylschwefelsaure Kalium auskrystallisirt war, schieden sich bei weiterem Zusatz von Aether nach einigem Stehen wieder Krystalle in ziemlicher Menge, kleine Drusen bildend, aus, die abfiltrirt und aus heissem Alkohol unkrystallisirt wurden. Indoxyl war in ihnen nur noch in sehr geringer Menge nachzuweisen, dagegen entstand beim Erwärmen mit Bariumchlorid und Salzsäure ein bedeutender Niederschlag von schwefelsaurem Barium. Nach mehrfachem Umkrystallisiren aus Alkohol wurde ungefähr ein Gramm glänzender kleiner Krystallblättchen erhalten. Diese entwickelten, im trockenen Reagirrohr erhitzt, einen sehr aromatischen, anisähnlichen Geruch zugleich mit etwas Phenolgeruch. Der Rückstand, in Wasser gelöst, gab mit Eisenchlorid keine Blaufärbung; da dieser Versuch mit aller Vorsicht angestellt wurde, zeigt er, dass das vorliegende ätherschwefelsaure Salz nicht im Wesentlichen aus p-Kresolschwefelsäure bestand¹⁾. Die weitere Untersuchung bestätigte diesen Schluss. Es wurden 0,7 gr. der über Schwefelsäure getrockneten Substanz mit Salzsäure in wässriger Lösung destillirt. Das Destillat roch sehr stark nach Phenol und gab mit Bromwasser einen beträchtlichen Niederschlag von Tribromphenol. Dann wurde der erkaltete Rückstand im Kolben mit Aether mehrmals ausgeschüttelt, die fast farblose ätherische Lösung auf dem heissen Wasserbade verdunstet gelassen. Es krystallisirten so weisse Blättchen aus. Diese, im trockenen Reagirrohr erhitzt, schmolzen, liessen etwas reizende Dämpfe entweichen, und sublimirten sehr leicht, indem sie sich als weisser Beschlag an den kälteren Theilen niederschlugen. Mit Eisenchlorid gaben sie keine Blaufärbung, mit ihm erhitzt etwas stechende Dämpfe. Die wässrige Lösung der Krystalle wurde mit Ammoniak braun gefärbt und reducirte salpetersaures Silber in der Kälte fast augenblicklich. Zu einer Analyse reichte die Menge der Substanz nicht aus.

Der mit Aether extrahirte Rückstand wurde mit Bariumchlorid versetzt und gab einen starken Niederschlag von

¹⁾ Vergl.: Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 9, S. 1389.

schwefelsaurem Barium, der abfiltrirt, gegläht und gewogen wurde. Die Substanz enthielt danach 25,3% SO_4 . Das aus dem Destillat ausgefällte Tribromphenol betrug etwas weniger, als der gefundenen Schwefelsäuremenge entsprechen müsste. Es war demnach die in der auskrystallisirten Masse enthaltene Aetherschwefelsäure fast ganz an Phenol gebunden. Auch in den Mutterlaugen war noch 0,185 gr. phenolschwefelsaures Kalium enthalten. Dieses zusammen mit den aus der reineren Portion enthaltenen 0,27 gr. gibt 0,455 gr. phenolschwefelsaures Kalium aus 25 Liter Harn oder 0,0018%. Es ist also im normalen Hundeharn dieses ätherschwefelsaure Salz in ziemlicher Menge vorhanden, denn die Darstellung war durchaus keine quantitative, da die Untersuchung sich anfänglich nur auf das indoxylschwefelsaure Kalium richtete. Trotzdem erhielt ich bei der Destillation des normalen Hundeharns mit Salzsäure durch Bromwasser im Destillat keine Phenolreaktion, wie dies häufig beobachtet wurde. Es muss also durch irgend welche im Harn vorhandenen Stoffe bei der Destillation mit Salzsäure das Uebergehen des Phenols verhindert werden und werden weitere Beobachtungen zeigen müssen, welcher Art diese sind. Auch die Indoxylschwefelsäure ist nach den im Vorstehenden mitgetheilten Beobachtungen in grösserer Menge im normalen Hundeharn enthalten, als man nach der mit dem Harn direkt angestellten Jaffe'schen Reaktion schliessen kann.

Da ich aus dem Harn der Kaninchen, denen Ortho-nitrophenylpropionsäure eingegeben war, mehrere Gramm indoxylschwefelsaures Kalium krystallisirt erhalten hatte, lag es nahe zu untersuchen, wie diese Substanz in den Organismus eingeführt, sich verhalte, ob sie weiter hydroxyliert werde oder ungestört ihn passire.

Es wurden demnach 2,7 gr. in wässriger Lösung einem kleinen Pinscher von 4 kg. Gewicht an einigen Stellen unter die Haut gespritzt. Einige Zeit lang war seine Schwefelsäureausscheidung controlirt und durch gleichmässige Fütterung in's Gleichgewicht gebracht worden. Die Schwefelsäureausscheidung war folgende:

Tag.	Harn- menge in ccm.	Specif. Gewicht.	Schwefelsäure in gr.			a : b
			a) prä- formirte.	b) ge- bundene.	c) ge- saunte.	
zwei normale.)	169	1060	1,1750	0,0623	1,2373	18,8
1.	253	1031	0,8232	0,3229	1,1462	2,5
2.	131	1020	0,3015	0,1091	0,4106	2,7
1. und 2.	384	1025	1,1247	0,4320	1,5568	2,6

Als 24 Stunden nach der Einspritzung der Substanz der in dieser Zeit gelassene Harn untersucht wurde, war er sehr verdünnt und hatte an Menge zugenommen, da das Thier ziemlich viel Wasser gesoffen hatte, was es sonst nicht that. Mit Salzsäure und unterchlorigsaurem Natrium schied sich in ihm eine bedeutende Menge Indigo aus, die Aetherschwefelsäure hatte im Vergleich zur präformirten ziemlich stark zugenommen. Der Harn drehte weder die Polarisations-ebene noch reducirte er abnorm. Das Thier hatte augenscheinlich starke Schmerzen an den Injektionsstellen; denn es suchte möglichst Bewegungen zu vermeiden, war stark deprimirter Stimmung und lag fast immer ruhig im Käfig, nahm aber seine gewöhnliche Fleischmenge zu sich. Der in einem weiteren Tag gelassene Harn war noch mehr verdünnt, gab auch starke Indoxyreaktion noch und enthielt viel mehr gebundene Schwefelsäure als normal. Das Befinden des Thieres war dasselbe, wie am ersten Tag, es frass seine Fleischportion ganz auf. Am nächsten Morgen ward der Hund todt gefunden; der von ihm noch kurz vor dem Tode gelassene Harn zeigte starke Indoxyreaktion, Vermehrung der gebundenen Schwefelsäure, gegenüber dem normalen Verhältniss. Die am selben Morgen ausgeführte Sektion ergab Folgendes: an den Injektionsstellen hatte sich eine ziemlich grosse, subcutane Höhle mit grünlich gefärbten, schmierigen Wänden gebildet. Das Fettpolster war gut entwickelt, die Leber normal, ebenso Milz und Nieren, in den Lungen war etwas Oedem vorhanden.

Der Urin, den der Hund in der Zeit nach der Einverleibung der Substanz gelassen hatte, wurde mit etwas

Kalilauge zum Syrup eingedampft, mit Alkohol gefällt, filtrirt, das Filtrat, wieder zur Dickflüssigkeit eingengt, mit heissem absoluten Alkohol extrahirt. Die so erhaltene Lösung hatte keine abnorm dunkle Färbung von rothem Farbstoff, wie dies bei dem nach Eingabe von Orthonitrophenylpropionsäure erhaltenen Harn der Fall war, enthielt aber sehr viel indoxylschwefelsaures Kalium.

Leider starb das Thier, das ziemlich klein und empfindlich war, eher, als die Ausscheidung des indoxylschwefelsauren Kaliums vollendet war. Da aber an den ersten Tagen nach der Injektion die präformirte Schwefelsäure fast genau gleichgeblieben, die gebundene stark vermehrt und eine sehr bedeutende Indoxylausscheidung zu constatiren war, so ist wohl mit Sicherheit anzunehmen, dass, wenn überhaupt, so nur geringe Mengen von dem eingebrachten indoxylschwefelsauren Kalium zersetzt sein konnten, und dieses zum allergrössten Theile intakt durch den Organismus ging.

Die Orthonitrophenylpropionsäure steht in naher Beziehung zu den Derivaten der Zimmtsäure, sie wurde von A. Baeyer aus der Orthonitrozimmtsäure dargestellt. Es schien mir daher angezeigt zu untersuchen, ob nicht vielleicht auch diese im Organismus in Indoxyl übergeht. Ich stellte mir die Orthonitrozimmtsäure nach der Methode von Beilstein und Kuhlberg¹⁾ in der Weise dar, wie sie von Tiemann und Oppermann²⁾ geschildert ist, indem ich Zimmtsäure nitrirte, die Nitrirungsprodukte äthylirte, durch Auflösen in heissem Alkohol und Auskrystallisirenlassen des Paraäthers den Orthoäther davon trennte, verseifte und mit starker Säure die freie Orthonitrozimmtsäure gewann. Die so erhaltene Substanz wurde einem gesunden Hund zunächst in der Gabe von 1 gr. mit dem Fressen eingegeben, und, da daraufhin keinerlei üble Wirkung auf den Organismus eintrat, schritt ich allmählig bis zu 4 gr. pro Tag fort. Die Indoxylschwefelsäure war nie vermehrt, doch war der Harn

¹⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. CLXIII, S. 126.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 13, S. 2059.

etwas dunkler gefärbt, als normal. Er war nicht optisch activ und reducirte nicht abnorm. Der eingedampfte und dann stark angesäuerte Urin wurde mit Aether extrahirt, die ätherische Lösung mit einer Lösung von kohlensaurem Natrium geschüttelt, die Sodalösung angesäuert, mit Aether extrahirt und so geringe Mengen einer in Nadeln krystallisirenden Substanz erhalten, die sich nicht wie Benzoësäure verhielt, aber zu einer genauen Untersuchung in zu geringer Menge vorhanden war.

Ferner machte ich einen Versuch mit Orthoamidozimmsäure. Auch diese wurde von dem Hund sehr gut vertragen in Dosen bis zu 3 gr. Das Verhältniss der gebundenen Schwefelsäure zur präformirten blieb dabei dasselbe, wie normal; auch war keine Vermehrung des Indoxyls zu constatiren. Der eingedampfte Harn wurde ebenso behandelt, wie der nach Eingabe von Orthonitrozimmsäure erhaltene und so eine braune Masse dargestellt, die nach einiger Zeit Krystalle abschied. Mit Wasser gekocht und durch Thierkohle filtrirt, schieden sich bald im Filtrat ölige Tropfen aus, von denen aus allmählig baumförmige Krystalle sich bildeten. Die letzteren konnten aber von den öligen Stoffen nicht vollständig getrennt werden, weder durch Umkrystallisiren noch durch die gewöhnlichen Lösungsmittel.

A. Baeyer und Drewsen¹⁾ haben neuerdings gezeigt, dass Orthonitrobenzaldehyd mit Aceton in alkalischer Lösung in Indigo übergeht. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob der Organismus wohl auch aus o-Nitrobenzaldehyd Indoxyl bildet, da in ihm auch Stoffe, die dem Aceton sehr nahe stehen, gebildet werden. So wurden denn einem kräftigen Hunde bis zu 3 gr. des Aldehyds gegeben, ohne dass jedoch der Harn eine verstärkte Indoxylausscheidung gezeigt hätte. Der Urin drehte weder die Polarisationsebene noch reducirte er abnorme Mengen Kupfersulfat. Nur einmal trat bei 3 gr. Nitrobenzaldehyd Erbrechen ein. Es wurden dem Thiere dann noch 2 gr. Orthonitrobenzaldehyd und 4 gr. Aceton zu gleicher Zeit gegeben. Auch daraufhin war die Indigo-reaktion des Harns nicht verstärkt.

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 15, S. 2826.