

Ueber die rothbraunen Farbstoffe bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans.

Von
Eyvin Wang.

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität zu Kristiania.

Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.

In einer früheren Mittheilung¹⁾ habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass andere Harnbestandtheile als Indigoblau aus dem Harn mit Chloroform extrahirt werden, weshalb ich eine Reinigung des Rückstandes nach dem Abdestilliren des Chloroforms vorgeschlagen habe.

Eine solche Befreiung des Chloroformresiduumes von fremden Beimengungen war schon von Obermayer²⁾ in Anwendung gebracht, indem er die rothbraunen Farbstoffe, welche sich neben Indigoblau bilden, mit 45^o wigem Alkohol entfernte. Diese Farbstoffe werden von Obermayer als Oxydationsprodukte des Indoxyls aufgefasst.³⁾ Trotzdem hat er es angezeigt gefunden, dieselben zu entfernen, weil neben diesen Farbstoffen auch andere Harnbestandtheile in das Chloroformextract übergehen, welche Kaliumpermanganat reduciren.

Um das Chloroformextract zu reinigen, habe ich eine Mischung von gleichen Volumtheilen Aether, Alkohol (96 und Wasser benutzt und dabei eine wässrige Lösung von Indigosulfosäure erhalten, welche reine blaue Indigofarbe hat. Diese Flüssigkeit ist aber nicht von fremden Körpern voll-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, 1899, S. 135.

²⁾ Wiener klin. Rundschau 1898, Nr. 34, S. 537.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVI, 1898, S. 427.

ständig befreit und ist deshalb erst nach Filtriren zur Titration geeignet. Vergleichende Versuche haben mir gezeigt, dass colorimetrische und titrimetrische Bestimmungen des Indigoblau nach diesem Verfahren übereinstimmende Resultate liefern.

Neulich ist Bouma¹⁾ zu dem Resultat gekommen, dass die Reinigung des Chloroformextractes nicht nur überflüssig, sondern ganz unrichtig sei, und dass man die besten Resultate mit meiner ursprünglichen Methode²⁾ erhalte. Die Reinigung wird von Bouma als eine sogenannte bezeichnet, weil die rothbraunen Farbstoffe, welche entfernt werden, nicht etwa von Skatoxyl herkommen, sondern Oxydationsprodukte des Indoxyls seien. Es ist bis jetzt aber kein Mittel gefunden worden, das gestattet, die Oxydation des Indoxyls so verlaufen zu lassen, dass Blau, Braun und Roth in bestimmtem Verhältniss zu einander gebildet werden. Die Waschmethoden würden nur dann brauchbare Resultate liefern, wenn das Mengenverhältniss der auftretenden Modificationen immer constant wäre.

Dass die rothbraunen Farbstoffe zu der Indigogruppe gehören, habe ich für nicht wahrscheinlich gehalten.³⁾ Sie sind nämlich in Aetheralkoholwasser sehr leicht löslich, während Indigoroth in Alkohol und Aether sehr schwer und Indigobraun in Alkohol sehr wenig löslich ist.

Für die Bildung dieser Farbstoffe stellt Bouma die Hypothese auf, dass sich Roth und Braun bei Depolymerisation des Indigoblau bilden, indem letzteres das grösste Indigomolekül darstelle. Für Polymerie führt Bouma die Beobachtung an, dass reines Indigoblau beim Kochen der Chloroformlösung desselben theilweise in Indigoroth umgebildet werde. Selbst habe ich reines, nach Fritzsche's Methode⁴⁾ dargestelltes Indigotin stundenlang mit Chloroform am Rückflusskühler ge-

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVII., 1899, S. 348.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXV., 1898, S. 406.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXVII., 1899, S. 438.

4) Gerhardt, Lehrbuch d. organ. Chemie 1855, Bd. 3, S. 567.

kocht, ohne irgend welche Aenderung der blauen Farbe wahrnehmen zu können; ebenso habe ich Indigoblau aus dem Harn, nachdem der Chloroformrückstand mit Aetheralkoholwasser gereinigt war, in derselben Weise mit Chloroform gekocht und habe auch in diesem Falle keine Bildung weder von Indigoroth noch Braun beobachten können.

Die Resultate Bouma's dürfen sich wahrscheinlich darauf beziehen, dass er mit unreiner Substanz gearbeitet hat. Das von ihm angewendete Kochen des käuflichen Indigos mit verdünnter Schwefelsäure ist zur Darstellung von reinem Indigotin kaum geeignet. Diese Substanz wird aber bekanntlich durch Oxydation von Indigoweiss sehr leicht in reinen Krystallen erhalten.

Das Chloroformextract des Harnindigos zeigt aber nicht nur öfters — wie Bouma bemerkt —, sondern fast ohne Ausnahme beim Abdestilliren des Chloroforms eine Aenderung der Farbe von Blau oder Blauviolett bis nahezu Burgunderroth. Diese Farbenänderung kann aber einer Depolymerisation nicht zugeschrieben werden.

Durch einen einfachen Versuch wird man sich davon überzeugen können, dass die Erwärmung beim Kochen oder Abdestilliren des Chloroforms keine Bildung von Indigoroth verursacht.

Mit drei gleichen Portionen habe ich Parallelversuche gemacht und zwar in der Weise, dass das Chloroform in der ersten Portion im Vacuum bei Zimmertemperatur abgedampft, in der zweiten wie gewöhnlich auf dem Wasserbade abdestillirt und in der dritten vor dem Abdestilliren die Lösung eine Stunde lang im Kolben mit Rückflusskühler gekocht wurde.

Der Rückstand besass bei sämtlichen Portionen das gleiche Aussehen. Nach dem Entfernen der rothbraunen Theile durch Waschen mit Aetheralkoholwasser und nachheriges Filtriren der wässrigen Lösung von Indigosulfosäure erhielt ich bei der Titration mit Kaliumpermanganat folgende Werthe:

I. 1,43 mg: II. 1,40 mg: III. 1,38 mg.

Man sieht also, dass weder die Destillation noch das langdauernde Kochen der Chloroformlösung die Resultate be-

einflusst. Die Rothfärbung während des Abdestillirens oder des Kochens kann somit nicht auf Depolymerisation und Bildung von Indigoroth beruhen, sondern muss fremden Farbstoffen zugeschrieben werden.

Von Skatoxyloth kann wohl nicht die Rede sein, da dieser Farbstoff sich ja nicht mit Chloroform extrahiren lässt.

Wenn die Hypothese Bouma's richtig wäre, könnte man sich auch kaum denken, dass Parallelanalysen, nach der Waschmethode ausgeführt, übereinstimmende Resultate liefern könnten. Die inconstante Bildung der verschiedenen Indigomodificationen, von welchen zwei (Roth und Braun) entfernt werden, würden nothwendiger Weise dazu führen, dass verschiedene Quantitäten Indigoblau als Rest für die titrimetrische Bestimmung übrig blieben.

Durch zahlreiche Parallelversuche habe ich mich doch immer überzeugen können, dass die gefundenen Indigowerte ausserordentlich gut übereinstimmen, sowohl wenn die Analysen mit gleich grossen Portionen, als auch wenn sie mit wechselnden Quantitäten desselben Harns ausgeführt wurden. Zur Illustration werden folgende Analysen dienen können:

Etwa 2 Liter Harn wurden mit Bleizucker gefällt und in 8 Portionen des Filtrates zu je 100 cem. die Indigomenge nach dem Waschen mit Aetheralkoholwasser und Filtriren der wässerigen Lösung von Indigosulfosäure bestimmt. Es wurden 0.96 — 0.90 — 1.04 — 0.90 — 0.89 — 0.93 — 0.96 und 0.90 mg Indigo gefunden.

Von demselben Harnfiltrat wurde

in 250 cem.	2.3 mg Indigo gefunden	= 0.92 mg per 100 cem.
200	1.86	= 0.98
100	0.95	= 0.95
50	0.45	= 0.90

Demnach scheint doch die Bildung von Indigoblau ziemlich constant zu sein.

Die Experimente Bouma's, nach welchen verschiedene Quantitäten Indigoblau erhalten werden, je nachdem die Oxydation des Indoxyls bei niedriger oder höherer Temperatur verläuft, lässt sich wohl auch anders als durch Depolymerisation

erklären. Ich habe immer gefunden, dass die Resultate bei Titration des Indigos auch bei Zimmertemperatur variiren können, je nachdem man die Mischung von Harn im Salzsäureeisenchlorid vor dem Chloroformausschütteln längere oder kürzere Zeit stehen lässt. Die Extraction mit Chloroform habe ich immer gleich nach dem Zusatz von Salzsäureeisenchlorid vorgenommen, während Obermayer empfiehlt, dieselbe erst nach einem Zeitraum von 15 Minuten anzufangen.

Vergleichende Versuche haben mir indessen gezeigt, dass es angezeigt ist, sogleich mit Chloroform zu extrahiren, sonst wird man immer, wie aus Folgendem hervorgehen wird, zu niedrige Indigowerthe erhalten:

Harnportionen à 250 ccm.		
a) Sogleich	mit Chloroform extrahirt:	1.95 mg Indigo
b)		1.88
c) Nach $\frac{1}{4}$ Stunde		1.50
d) $\frac{1}{2}$ >		1.43
e) 1 >		1.43
f) 2 >		1.43

In obenstehender Versuchsreihe habe ich das Residuum mit Aetheralkoholwasser ausgewaschen. Es wäre somit nach Bouma — möglich, dass der Verlust an Indigoblau durch Bildung der modificirten durch das Waschen entfernten Farbstoffe bedingt wäre. Dies ist aber nicht der Fall, denn Parallelbestimmungen, nach meiner ursprünglichen Methode (ohne Waschen) ausgeführt, geben vollständig analoge Resultate. Es scheint also sichergestellt zu sein, dass das Stehen der Harnsalzsäuremischung durch kürzere oder längere Zeit vor der Chloroformextraction einen Verlust an Indigo bedingt.

Dieser Verlust darf entweder auf eine bei der langdauernden Einwirkung weiter als bis zum Indigoblau gehende Oxydation des Indoxyls bezogen oder dadurch erklärt werden, dass sich das Indigotin beim Stehen krystallinisch ausscheidet und in diesem Zustande nur sehr schwer in dem Chloroform aufgenommen wird.

Bouma hat die niedrigste Indigomenge gefunden, wenn die Oxydation bei etwa 0° verläuft. Bei dieser Temperatur nimmt er eine langsame Oxydation an und lässt längere Zeit

im Eis stehen. Der Rückstand zeigt sich dann auf der weissen Porzellanschale rothviolett und die in der Schale zurückbleibende Menge reines Indigoblau war etwa die Hälfte kleiner als wie aus gleichen Harnmengen, wenn die Oxydation bei Zimmertemperatur sowie bei etwa 45° verlief. In diesen beiden letzten Fällen hat er aber die Extraction sogleich oder jedenfalls schon 10–15 Minuten nach dem Zusatz von Salzsäure angefangen.

Bouma gibt ferner nicht an, in welcher Weise er kontrollirt hat, dass er wirklich die ganze Indoxylmenge als Indigo-farbstoffe erhalten hat, sagt nur, dass der Rückstand in der ersten Portion rothviolett war, während derselbe sich bei den zwei übrigen Bestimmungen blau mit rothbraunem Belag und fast rein blau mit sehr geringer Rothfärbung zeigte. Aus diesem Verhältniss scheint Bouma den Schluss zu ziehen, dass die fehlende Menge Indigoblau als eine rothe Modification vorhanden sei.

Dass die Farbe der rothen oder rothbraunen Beimengungen bei einem Mindergehalt von Blau stärker hervortritt, scheint mir aber sehr natürlich zu sein. Dies mag jedenfalls kaum mehr beweisen, als dass die fremden Farbstoffe relativ in reichlicher Menge vorhanden sind, sagt aber über deren absolute Menge nichts aus.

Um den Einfluss der verschiedenen Temperaturen bei der Oxydation des Indoxyls nachzuprüfen, habe ich Parallelbestimmungen mit gleichen Portionen Harnfiltrat ausgeführt. Einerseits wurden Harn und Salzsäureeisenchlorid von etwa 20° gemischt, wobei die Temperatur bis 37° emporstieg. Andererseits wurden Harn und Salzsäureeisenchlorid vor der Mischung bis zu 0° abgekühlt; die Temperatur stieg diesmal nur zu 15° . In beiden Fällen wurde sogleich mit Chloroform extrahirt und die gefundenen Indigomengen waren gleich bei 37° 0.87 mg. und bei 15° 0.83 mg).

Die spektroskopischen Untersuchungen Bouma's habe ich noch nicht nachprüfen können, da es mir nicht gelungen ist, aus Pflanzenindigo und Harnindican einheitliche rothbraune Farbstoffe zu erhalten. Durch Kochen des käuflichen Madras-

und Bengalindigos mit verdünnter Schwefelsäure und Auswaschen des Rückstandes mit Wasser erhielt ich ein Indigo, welches mit Chloroform in Kolben mit Rückflusskühler gekocht, zuerst eine blaue und dann eine blauviolette Farbe zeigte. Die Lösung, in einer Schale verdunstet, lieferte aber nur einen blaugefärbten Rückstand mit röthlichem Kupferglanz und keine rothbraunen Farbstoffe, wie sie sich beim Abdampfen des Chloroformextractes von Harnindigo zeigen.

Der Chloroformrückstand des künstlichen Indigos lieferte mit Aether behandelt eine stark purpurrothe Lösung; mit Alkohol liess sich aber kein kaffeebrauner Farbstoff ausziehen. Der Rückstand des Harnindigos, mit Aether behandelt, liefert aber keine purpurrothe Lösung, sondern eine schwach röthlichgelbe Flüssigkeit, die sich in allen Concentrationen anders als die obengenannte purpurrothe Lösung verhält. Mit Alkohol habe ich, wie Bouma, aus dem Rückstand des Harnindigos auch eine kaffeebraune Lösung erhalten, die aber bei Anwendung von 96°'igem kaltem Alkohol gar nicht frei von Indigoblau ist.

Gegen die Annahme, dass es sich um Depolymerisation des Indigoblau oder Entstehung verschiedener Modificationen der Indigofarbstoffe handelt, spricht ganz bestimmt die Thatsache, dass die Nahrung sowohl auf die Bildung der rothbraunen Farbstoffe wie auf andere fremde Bestandtheile, welche störend auf die Titrirung einwirken, einen bedeutenden Einfluss hat. Dieses geht unzweideutig aus meinen Fütterungsversuchen mit Hunden¹⁾ hervor: Einige Tage, nachdem die Thiere eine Nahrung bekamen, welche hauptsächlich aus Fleisch bestand, zeigte sich die Reinigung mit Aetheralkoholwasser für die nach meiner ursprünglichen Methode gefundenen Indigowerte von geringer Bedeutung, weil die Menge der rothbraunen Farbstoffe durch Fleischnahrung erheblich verringert wurde. Selbstversuche haben mir ebenfalls gezeigt, dass reine Fleischnahrung eine bedeutende Verminderung sowohl der rothbraunen Farbstoffe wie anderer fremder Bestandtheile bewirkt

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, 1899, S. 573.

Hiernach scheint es nicht möglich, dass die rothbraunen Antheile verschiedene Modificationen des Indigos darstellen, und die Bildung von Indigoroth und Braun neben Indigoblau scheint mir noch zweifelhaft zu sein. Bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans nach der von mir angegebenen Methode wird man sie jedenfalls nicht in Betracht nehmen können. Ausser diesen Farbstoffen gehen nämlich andere Harnbestandtheile in das Chloroformextract über, welche mit Schwefelsäure Verbindungen eingehen, die reducirend auf Kaliumpermanganat einwirken und deshalb nothwendiger Weise entfernt werden müssen. In dieser Beziehung wäre erstens Hippursäure zu erwähnen, welche von concentrirter Salzsäure in Benzoesäure und Glycocoll gespalten wird. Die im Chloroform aufgenommene Benzoesäure bildet aber mit concentrirter Schwefelsäure eine Sulfosäure, die löslich im Wasser ist und Chamäleonlösung reducirt. Ferner kommt Phenol in jedem Harn als phenol-schwefelsaures Kalium vor und wird durch die concentrirte Salzsäure zerlegt, und Phenol geht in das Chloroformextract über. In gleicher Weise verhalten sich wahrscheinlich aromatische Oxysäuren. Es sind somit in jedem Harn viele Verbindungen vorhanden, welche störend auf die Indigotitrirung einwirken, wenn sie nicht durch eine Waschmethode von dem Chloroformrückstand entfernt werden.

Dass die vielfach erwähnten braunen Farbstoffe der Indigo-gruppe nicht angehörig sind, glaube ich wahrscheinlich gemacht zu haben; dass sie es wenigstens theilweise nicht sind, lässt sich durch die Lösungsverhältnisse direkt beweisen, denn schon kaltes Wasser zieht aus dem Chloroformrückstand einen gelben, warmes Wasser dazu noch einen braunen Farbstoff aus. Die Indigofarbstoffe sind aber in Wasser unlöslich.

Auch ungefärbte, die Titrirung störende Verbindungen machen, wie ich schon früher gezeigt habe, eine Reinigung nothwendig. Nach der Beseitigung der rothbraunen Antheile des Rückstandes mit 45° eigem Alkohol habe ich durch Waschen mit Aetheralkoholwasser noch farblose, durch Kaliumpermanganat oxydirbare Verbindungen entfernen können. — Schliess-

lich habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass die vollständige Befreiung des Rückstandes von fremden Beimengungen auch durch dieses Waschungsmittel noch nicht erreicht wird, indem man übereinstimmende Resultate bei colorimetrischen und titrimetrischen Bestimmungen erst dann erhält, wenn die wässrige Lösung der Indigosulfosäure filtrirt wird.

Ich komme nach Allem, was ich oben dargelegt habe, zu dem Resultat, dass die Reinigung des Chloroformrückstandes bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans richtig und nothwendig ist.

Kristiania, 12. September 1899.