

## Ueber die bei der Behandlung des Harnindicans mit Ferri-chloridsalzsäure auftretenden rothbraunen Farbstoffe.

Von

Jac. Bonma.

---

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Juni 1900.)

---

Gegen die von mir vertheidigte Meinung, dass bei der Indicanbestimmung nach Obermayer neben Indigoblau in wechselnder Menge auch Indigoroth und Indigobraun gebildet werden,<sup>1)</sup> und dass also eine zuverlässige Bestimmung des im Harn vorhandenen Indoxyls nicht zu erreichen ist, wenn, wie von Wang gefordert wird, der Farbstoff vor der Titration mit Chamäleon, mittelst Alkoholätherwasser ausgewaschen wird, hat Wang Einspruch erhoben.<sup>2)</sup> Erstens hält dieser Forscher es für unwahrscheinlich, dass die rothbraunen Antheile zur Indigogruppe gehörig seien, und zweitens finden sich nach Wang im Chloroformextract des nach Obermayer behandelten Harns auch farblose Substanzen, welche Chamäleon reduciren. Es soll deshalb richtig und nothwendig sein, den Chloroformrückstand bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans in der angegebenen Weise zu reinigen.

In meiner vorigen Mittheilung betonte ich, dass sowohl der braune und der rothe, als der blaue Bestandtheil des Chloroformrückstandes in Bezug auf Löslichkeit und auf spektroskopisches Verhalten von den aus Pflanzenindican bereiteten Indigofarbstoffen nicht zu unterscheiden sind. Ich kann jetzt

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 348.

2) Ibid., Bd. XXVIII, S. 576.

hinzufügen, dass ich auch die Sublimationstemperatur von aus Harn bereitetem Blau und Roth verglichen habe mit der Temperatur, bei welcher «reinstes» Indigoblau und Indigoroth, die ich aus der Bayer'schen Fabrik erhalten habe, sublimiren. Auch in dieser Hinsicht fand ich völlige Uebereinstimmung. In beiden Fällen war die Sublimationstemperatur für den blauen Farbstoff 220° C., für den rothen 190° C. Wenn aber auch zugegeben wird, dass bei der Behandlung nach Obermayer der Harn neben Indigoblau auch Indigoroth und Indigobraun liefert, so ist damit nicht gesagt, dass der Chloroformrückstand nicht noch andere Stoffe enthält, welche das Chamäleon zu reduciren im Stande sind und bei der Titration einen unberechenbaren Fehler veranlassen. Wenn es sich thatsächlich herausstellte, dass dies der Fall sei und also Waschung mit Aetheralkoholwasser, wodurch auch das Roth und das Braun entfernt werden, der Titration vorausgehen muss, so wäre der Werth der Bestimmung sehr geschmälert. Denn es steht, wie ich unten noch an Beispielen zeigen werde, die Menge des gebildeten Indigoblau, bei Menschenharn wenigstens, keineswegs in einem constanten Verhältniss zu dem im Harn vorhandenen Indoxyl. Zur Prüfung der Frage, ob der Chloroformrückstand als ein Gemenge verschiedener reducirender Substanzen zu betrachten sei, habe ich untersucht, wie sich das Gewicht desselben zu dem Reductionsvermögen verhält. Besteht der Rückstand nur aus Indigo, so wird das Resultat der Wägung mit demjenigen der Titrirung übereinstimmen: liegt aber ein Gemenge verschiedener reducirender Stoffe vor, so wird die Menge der verbrauchten Chamäleonlösung den Gewichtsmengen des verwendeten Blau, Roth und Braun nicht proportional sein. Bevor ich meine hierauf Bezug habenden Befunde beschreibe, bemerke ich, dass ich den Harn vor der Behandlung mit dem Obermayer'schen Reagens nicht, wie Wang es vorschreibt, mit neutralem Bleiacetat, sondern mit Bleiessig ausfällte, und zwar so, dass auf je 100 cem. Harn 10 cem. der Sol. acet. plumb. bas. hinzugefügt wurden. Auf diese Weise wird u. A. auch die Hippursäure, welche von Wang als eine der Fehlerquellen genannt wird, entfernt. Ich fand dann auch das

Reductionsvermögen des Chloroformrückstandes beim Gebrauch von Bleiessig kleiner als beim Gebrauch des Bleizuckers.

So wurde von normalem Harn ein Theil mit neutralem, ein anderer Theil mit basischem Bleiacetat gefällt. Von beiden Filtraten wurden je 200 cem. Harn entsprechende Mengen weiter verarbeitet. Der Chloroformrückstand der ersten Portion verbrauchte 5,8 cem., der Rückstand der mit Bleiessig behandelten 5,3 cem. der Chamäleonlösung.

Viel schärfer trat der Unterschied hervor beim Vorhandensein von Salicylursäure im Harn.

Herr Prof. Dr. Salkowski hatte die Freundlichkeit, Herrn Prof. Pekkelharing darauf aufmerksam zu machen, dass die Anwesenheit dieser Säure im Harn sehr störend wirkt bei der ursprünglich von Wang befolgten Methode.

Als mir dies mitgetheilt wurde, untersuchte ich, ob nicht auch hier vielleicht der Gebrauch des neutralen Bleisalzes den Grund des Fehlers abgeben konnte.

An zwei aufeinander folgenden Tagen gebrauchte ich je 5 g Natriumsalicylat. Der Harn des zweiten Tages, welcher eine starke Salicylursäurereaction gab, wurde gesammelt. Ein Theil desselben wurde mit Bleizuckerlösung, ein anderer Theil mit Bleiessig gefällt und weiter nach Obermayer behandelt. Sobald die Ferrichloridlösung hinzugefügt wurde, zeigte das mit dem neutralen Bleiacetat behandelte Filtrat eine starke Salicylursäurereaction, während die mit dem basischen Salz gefällte Flüssigkeit keine Spur davon bemerken liess. Der Chloroformrückstand einer 200 cem. Harn entsprechenden Filtratmenge verbrauchte nach Fällung mit Bleizucker 6,7 cem., nach Fällung mit Bleiessig 5,5 cem. der Chamäleonlösung. Dann möchte ich noch auf eine andere Fehlerquelle hinweisen. Wenn das Chloroform aus dem Scheidetrichter abgelassen wird, finden sich darin gewöhnlich zahlreiche sehr feine Harntröpfchen. Wird dann das Chloroform sofort abgedampft, so ist der Rückstand mit diesen Tröpfchen, welche vielleicht reducirende Bestandtheile enthalten, verunreinigt. Am besten ist es, das in eine Schale aufgefangene Chloroform einige Zeit sich selbst zu überlassen. Die Harntröpfchen fliessen dann zu grösseren

zusammen und bleiben jetzt beim Abgiessen des Chloroforms an der Wand der Schale haften.

Schliesslich bemerke ich, dass ich den Chloroformrückstand zur Entfernung flüchtiger Bestandtheile (wie Phenol) vor der Behandlung mit Schwefelsäure etwa zwei Stunden bei 110° C. getrocknet habe. Verflüchtigung des Indigo ist dabei nicht zu befürchten, nachdem die flüchtigste Modification desselben, das Indigo-roth, erst bei 190° die erste Spur von Sublimation zeigt. Aus dem in dieser Weise behandelten Rückstand konnte mit Wasser weder Farbstoff, noch irgend eine farblose reducirende Substanz ausgezogen werden.

Ich werde jetzt einige Versuche anführen, welche zur Beantwortung der Frage, ob der rothe und der braune Farbstoff auch in dem Reductionsvermögen sich wie Indigo verhalten, angestellt wurden.

Aus einigen Litern Harn wurde das Indigo in der beschriebenen Weise bereitet. Der getrocknete Rückstand wurde erst mit Aether, dann mit Alkohol ausgewaschen. Wie ich früher schon mitgetheilt habe, geht beim Abspülen des Chloroformrückstandes mit Aether nur das Roth in Lösung. Zwar ist auch das Blau einigermaßen in Aether löslich; es wird aber durch das in Aether unlösliche Braun, welches das Blau bedeckt, vor dem Aether geschützt. Man muss sich dabei vor mechanischer Entfernung des Blau hüten. So konnten die drei Farbstoffe gesondert erhalten, abgedampft, auf 110° C. erwärmt (bis kein Gewichtsverlust mehr stattfindet), gewogen, in Schwefelsäure gelöst und mit Chamäleon titirt werden.

I. Aus 5 Liter Harn wurde erhalten:

7.1 mg Roth verbraucht	29.9 cem. Chamäleon	11 : 7.1 = 44.3 : 28.6
6.4 » Braun	26.4 »	11 : 6.4 = 44.3 : 25.8
11.0 » Blau	44.3 »	

II. Aus 4 Liter Harn:

17.4 mg Roth — Braun verbraucht	41.3 cem. Chamäleon	10.6 : 17.4 = 19.3 : 39
8.6 » Blau	19.3 »	

III. Aus 3,4 Liter Harn:

11.1 mg Roth verbraucht	25.0 cem. Chamäleon	7 : 11.1 = 15.7 : 24.9
5,4 » Braun	14.2 »	7 : 5.4 = 15.7 : 12.1
7.7 » Blau	15.7 »	

IV. Aus 4 Liter Harn:

12.0 mg Roth	verbraucht	34.4 ccm. Chamäleon	$(5.2 : 12.8 = 13.1 : 32.2)$
0.6 » Braun	»	26.7 »	$(5.2 : 0.6 = 13.1 : 21.6)$
5.2 » Blau	»	13.1 »	

Die reducirende Kraft des Roth und Braun ist also, wie aus den eingeklammerten Zahlen ersichtlich, derjenigen des Blau ziemlich gleich. Selbstverständlich wurde in jedem Versuch mit derselben Chamäleonlösung titirt.

Die Uebereinstimmung ist nicht vollkommen, dennoch, wie mir scheint, befriedigend. Der Farbenwechsel beim Titiren ist nicht so scharf, dass man jedesmal sicher sein kann, die Grenze ganz genau festgestellt zu haben. Am Ende hat die Flüssigkeit die gelbliche Farbe des Isatin, und es ist oft schwer zu entscheiden, ob eine Spur des blauen oder des braunen Farbstoffs dabei noch vorhanden ist. Mir war es am leichtesten, beim Roth die Endreaction festzustellen. Sind alle drei Farbstoffe zusammen, so hat man nur das Roth, welches nach dem Blau und dem Braun von Chamäleon angegriffen wird, zu berücksichtigen.

Bei der Titirung von «reinstem», aus der Bayer'schen Fabrik erhaltenen Indigoblau und Indigoroth fand ich ebenso wenig völlige Uebereinstimmung.

Versuch:

30.5 mg Blau	verbraucht	86.9 ccm. Chamäleon	$(30.5 : 11.4 = 86.9 : 32.5)$
11.4 » Roth	»	30.6 »	

Zwar wurde hier das Reductionsvermögen des Roth, im Verhältniss zu demjenigen des Blau, ein wenig zu schwach gefunden, während beim Harnindigo eben das Gegentheil der Fall war. Das kann aber eine Zufälligkeit sein. Beim Arbeiten mit so verdünnten Lösungen, wie es hier geboten ist, dürfen die gefundenen Unterschiede wohl als innerhalb der Fehlergrenzen gelegen zu betrachten sein.

Der rothe und der braune Farbstoff, welche bei der Oxydation des Harns mittelst Ferrichlorid entstehen, stimmen also in allen Hinsichten, so weit das bis jetzt zu untersuchen möglich war, mit Indigo überein und sind also, meiner Ansicht nach, ebensogut wie das Indigoblau als Oxydations-

produkte des Indoxyls zu betrachten. Die drei Modificationen werden aber, wie ich früher schon bemerkt habe, und wie aus den vorangehenden Zahlen hervorgeht, in meinen Versuchen gar nicht in einem festen gegenseitigen Verhältniss gebildet. Wang führt dagegen an, er habe bei verschiedenen Portionen desselben Harns ziemlich constante Zahlen für das Indigoblau erhalten (nach Auswaschen mit Aetheralkoholwasser).<sup>1)</sup> Diese Zahlen beziehen sich aber auf denselben Harn, der in derselben Weise, nur in verschiedenen Mengen, behandelt wurde. Ich muss aber daran festhalten, dass die Art der Behandlung bei demselben Harn und die Art des Harns bei derselben Behandlung auf die relativen Mengen der aus dem Indoxyl entstehenden Farbstoffe Einfluss hat. In meiner vorigen Mittheilung habe ich angegeben, dass schon Erhitzen der Chloroformlösung Indigoblau theilweise in Indigoroth umwandeln werde. Ich muss Wang zugeben, dass ich mich in dieser Angabe geirrt habe. Beim Nachprüfen mit reinem, aus der Bayer'schen Fabrik erhaltenem Indigoblau habe ich diese Angabe nicht bestätigt gefunden.

Dass aber die Temperatur, bei welcher die Oxydation stattfindet, von Einfluss ist, daran muss ich entschieden festhalten. Wang sucht meine früher mitgetheilten hierauf bezüglichen Befunde durch die Bemerkung zu erklären, dass dabei die zwischen dem Anfang der Reaction und dem Ausschütteln mit Chloroform verlaufende Zeit viel grösser war bei den bei niedriger Temperatur, als bei den bei 45° C. angestellten Versuchen.<sup>2)</sup> Dass diese Erklärung nicht zutrifft, geht aus dem folgenden Versuch hervor. 750 ccm. Filtrat von mit Bleiessig behandeltem Harn, wurden in 3 gleiche Theile vertheilt. Portion I wurde auf 0° C. abgekühlt und mit 250 ccm. ebenfalls auf 0° C. abgekühltem Obermayer'schem Reagens vermischt. Portion II wurde bei 17° C., Portion III bei 45° C. mit derselben Menge Reagens von gleicher Temperatur wie das Harnfiltrat vermischt. In I stieg die Temperatur bis auf

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 579.

<sup>2)</sup> l. c. S. 581.

4° C., in II bis auf 22° C. und in III bis auf 54° C. Jede Portion wurde genau 15 Minuten nach dem Zusatz des Reagens mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Ausschütteln wurde noch zweimal mit neuem Chloroform wiederholt. Für alle drei Portionen wurden gleiche Mengen Chloroform verwendet. Ich fand jetzt, nach Lösung des mit Aetheralkoholwasser ausgewaschenen und erhitzten Chloroformrückstandes in Schwefelsäure, mittelst Titration in Portion I 0,6, in Portion II 1,4 und in Portion III 2,7 mg Indigoblau.

Uebrigens habe ich die Angabe Wang's, nach welcher das Stehen der Harnsalzsäuremischung durch kürzere oder längere Zeit von der Chloroformextraction einen Verlust an Indigo bedingt,<sup>1)</sup> in meinen Versuchen nicht bestätigt gefunden.

Sechs Portionen desselben Filtrats von mit Bleiessig behandeltem Harn, jede zu 250 ccm., wurden mit dem gleichen Volumen des Obermayer'schen Reagens bei Zimmertemperatur versetzt und nach verschiedener Zeit mit gleichen Mengen Chloroform extrahirt. Die Chloroformrückstände wurden mit Aetheralkoholwasser gewaschen, bei 110° C. erhitzt und in Schwefelsäure gelöst. Das gebildete Indigoblau wurde mittelst Titration bestimmt. Das Ergebniss war:

I. Sogleich	extrahirt	0,3 mg Indigoblau
II. nach 15 Min.	„	1,1 „
III. „ 30	„	1,5 „
IV. „ 1 Stunde	„	1,6 „
V. „ 2 Stunden	„	1,6 „
VI. „ 4	„	1,6 „

Portion I wurde nach 1 Stunde nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt und lieferte dann noch 1,3 mg Indigoblau. Wang erhielt die grössten Mengen Indigoblau, wenn er sogleich extrahirte.<sup>2)</sup> Meiner Erfahrung nach ist es also am besten, nach dem Zusatz der Eisenchlorid enthaltenden Salzsäure wenigstens eine halbe Stunde zu warten, bevor die Extraction mit Chloroform vorgenommen wird.

Im Allgemeinen wird bei der Behandlung des Harns mit

<sup>1)</sup> l. c. S. 580.

<sup>2)</sup> l. c. S. 580.

Ferrichloridsalzsäure bei Zimmertemperatur eine sehr deutlich wahrnehmbare Menge Indigoblau gebildet. Bisweilen aber findet sich Harn, welcher in dieser Weise kein oder nahezu kein Indigoblau liefert, so dass die Anwendung der Wang'schen Methode auf beinahe völlige Abwesenheit von Indoxyl schliessen lassen würde. Solchen Harn habe ich öfters unter den Händen gehabt. In den meisten Fällen stammte derselbe von an Chlorose leidenden Mädchen, welche Symptome der Besserung zeigten. Beim Ausschütteln wird dann das Chloroform roth. Dass man in solchen Fällen fehl gehen würde, wenn man daraus schliessen wollte, der Harn sei sehr arm an Indican, geht aus folgendem Beispiel hervor. Mir wurde Harn zur Untersuchung gegeben mit der Mittheilung, dass darin kein Indican nachzuweisen sei. Das Chloroform zeigte nach dem Ausschütteln eine rothe Farbe, ohne merkbare Beimischung von Blau.

Zwei Portionen von je 250 ccm. wurden jetzt in der gewöhnlichen Weise behandelt, I bei Zimmertemperatur, II bei 45° C. Das Chloroformextract von I war roth, der Auszug von II violett. Die Chloroformrückstände wurden mit Aetheralkoholwasser ausgezogen. Von Portion I hinterblieb in der Porcellanschale eine kaum bemerkbare Spur; von Portion II hingegen ein rein blauer Belag, welcher in Schwefelsäure gelöst als Indigoblau titirt werden konnte. Bei Berücksichtigung des gesammten Chloroformrückstandes stellte es sich heraus, dass aus dem in 24 Stunden ausgeschiedenen Harn, welcher Anfangs für so gut wie indoxylfrei erklärt worden war, 4,4 mg Indigo erhalten wurde. Wie ich glaube, liefern solche Fälle den überzeugenden Beweis, dass es unrichtig ist, nur das aus dem Harn gebildete Indigoblau für die Bestimmung des Indicans zu verwenden. Von der Temperatur, bei welcher die Oxydation stattfindet, hängt es ab, ob eine bestimmbare Menge oder nur sich der Bestimmung entziehende Spuren von Indigoblau entstehen.

Selbstverständlich muss ich die Möglichkeit offen lassen, dass es in gewissen Fällen nicht gelingen wird, die aus Harn bereiteten Indigofarbstoffe völlig von anderen reducirenden

Beimischungen zu trennen. Es scheint mir aber aus dem Vorangehenden geschlossen werden zu dürfen, dass für gewöhnlich die Reinigung durch Fällung des Harns mit Bleiessig und Erhitzen des Chloroformrückstandes auf 110° C. wenigstens für praktische Zwecke hinreichend ist. Dass das in Aether lösliche Roth und das in Alkohol und in verdünntem Alkali lösliche Braun Indigofarbstoffe sind, glaube ich nicht nur dieser Löslichkeitsverhältnisse wegen annehmen zu dürfen, sondern auch wegen des spektroskopischen Verhaltens des Reductionsvermögens, ferner weil man es in der Hand hat, durch Aenderung der Temperatur die blaue Modification statt der rothen in den Vordergrund treten zu lassen.

---