

## Ueber die Bestimmung des Harnindicans als Indigoroth mittelst Isatinsalzsäure.

Von  
**Jac. Bouma.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität in Utrecht.)  
Der Redaction zugegangen am 22. December 1900.)

Wie ich früher auseinandergesetzt habe,<sup>1)</sup> glaube ich annehmen zu dürfen, dass bei der Oxydation des Indoxyls im Harn mittelst Ferrichloridsalzsäure, neben dem Indigoblau, in wechselnder Menge auch Indigoroth und Indigobraun gebildet wird: demzufolge ist man verpflichtet, bei der Harnindicantbestimmung mittelst Obermayer's Reagens die drei Formen des Indigos sämmtlich in Betracht zu nehmen.

Beim Suchen nach einem Mittel, um alles Indoxyl des Harns in eine einzelne Form von Indigo umzusetzen, wurde mir der Weg gezeigt durch eine Bemerkung von Prof. Beyerink, welcher eine Lösung von Isatin in Salzsäure angewendet hat, um Indican in Pflanzenzellen nachzuweisen, und dabei bemerkte, dass auch das Indoxyl des Harns viel besser mittelst Isatin als Indigoroth als in der Form von Indigoblau nachgewiesen werden kann.<sup>2)</sup>

Wirklich wird beim Kochen frischen Harns mit Salzsäure und Isatin alles Indoxyl des Harns in Indigoroth umgewandelt.

Diese Reaction hat zwei Vortheile: erstens wird nur ein Farbstoff gebildet, während bei der Bildung von Indigo durch

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXX., S. 117.

<sup>2)</sup> Versl. Kon. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, 31. März 1900.

Oxydation von Indoxyl die Farbe des in Chloroform löslichen Stoffes in verschiedenen Fällen sehr wechselnd ist (einmal mehr blau, dann wieder mehr roth, bisweilen auch, zufolge der Anwesenheit von viel Indigobraun, nicht leicht mit einem Namen zu bezeichnen); zweitens ist das Quantum des gebildeten Indigo doppelt so gross als bei der Oxydation des Indoxyls. Im ersten Falle liefert jedes Molekül Indoxyl, indem es sich mit einem Molekül Isatin, unter Austritt von einem Molekül Wasser, verbindet, ein Molekül Indigo, während bei den Methoden von Jaffé und von Obermayer für die Bildung jedes Moleküls Indigo zwei Moleküle Indoxyl nöthig sind. Demzufolge wird die Empfindlichkeit der Reaction durch Behandlung des Harns mit Isatin verdoppelt.

Ich habe nun diese Reaction benutzt, um den Gehalt des Harns an Indican zu bestimmen.

In erster Reihe musste untersucht werden, wie stark die Lösung von Isatin in Salzsäure sein muss, um das Reagens praktisch verwendbar zu machen. Man muss dabei mit folgenden Factoren rechnen: erstens muss alles Indoxyl in Indigo umgebildet werden; es muss also genügend Isatin in der Lösung vorhanden sein; zweitens muss man nicht zuviel Isatin gebrauchen, da der Ueberschuss, der nicht an Indoxyl gebunden worden ist, aus dem Chloroformresiduum mittelst Wasser extrahirt werden muss. Nach den zahlreichen Bestimmungen von Harnindican, welche von mir gemacht wurden, fand ich, dass eine Lösung von 20 mg. Isatin in 1 Liter concentrirter Salzsäure ein passendes Reagens ist. Für die Indicanbestimmung von sehr reichhaltigen Harnen thut man besser, das Filtrat des mit Bleiessig gefällten Harns mit Wasser zu verdünnen, wodurch obendrein verhütet wird, dass Indigo-roth sich krystallinisch im Scheidetrichter absetzt.

Den ungefähren Gehalt an Indican des Harns kann man vorher mittelst Isatinsalzsäure colorimetrisch bestimmen. Man kocht dazu gleiche Volumina Harn und Reagens und schüttelt danach aus mit Chloroform. Beim Gebrauch von 5 ccm. Harn mit 5 ccm. Reagens und 2 ccm. Chloroform färbt sich letzteres bei indicanarmem Harn leicht rosaroth, bei leichter Indican-

urie schön purpurroth und bei indicanreichem Harn intensiv dunkel weinroth. Im letzteren Falle ist Verdünnung des Filtrats mit Wasser geboten. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut zur klinischen Bestimmung des Harnindicans: auf diese klinisch-colorimetrische Methode komme ich unten ausführlicher zurück.

Die titrimetrische Bestimmung des Harnindicans wird folgender Weise vorgenommen. Der Harn wird mit Bleiessig (1 Volumen auf 10 Volumen Harn) gefällt, das klare Filtrat mit dem gleichen Volumen Isatinsalzsäure versetzt und eine Viertelstunde auf dem kochenden Wasserbade erhitzt: das Gemisch färbt sich dabei gewöhnlich dunkelroth. Nach dieser Bearbeitung wird die Flüssigkeit abgekühlt und in dem Scheidetrichter mit Chloroform ausgeschüttelt. Man lässt nun das Chloroformextract einige Minuten ruhig stehen, damit sich die Tröpfchen mechanisch mitgeführten Harns an der Schaaale absetzen: danach wird die Lösung vorsichtig abgossen, das Chloroform verdunstet und der Rückstand zwei Stunden bei 110° C. getrocknet. Nach dieser Behandlung muss der Rückstand vom überflüssigen Isatin befreit werden, denn das in der Salzsäurelösung befindliche Isatin wird nicht ganz verbraucht: der Ueberschuss geht in das Chloroformextract über und bleibt nach Verdunsten des Chloroforms im Residuum zurück. Da nun das Isatin beim Erhitzen des Rückstandes auf 110° C. nicht verflüchtigt, muss man den Chloroformrückstand mit heissem Wasser, worin das Isatin leicht löslich ist, ausziehen, bis die abgessene Flüssigkeit nicht mehr reducirt. Diese Entfernung des Isatins ist nothwendig, da dasselbe als Isatinschwefelsäure bei der Titration, zugleich mit der Indigoschwefelsäure, Chamäleon verbraucht.

Nach den erwähnten Reinigungen wird das trockene Residuum mit Schwefelsäure versetzt und als Indigorothisulfosäure mit Chamäleon titirt.

Bezüglich der Titration des Indigorothis muss ich bemerken, dass, während bei der Titration des Indigoblaus als Disulfosäure eine Verdünnung von mindestens 1 auf 20000 geboten ist, man bei der Titration des Indigorothis diesen Ver-

dünnungsgrad nicht überschreiten darf, da man sonst zu viel Chamäleon verbraucht. Die Titrirflüssigkeiten müssen ganz klar sein: bei leichter Trübung ist der Farbenwechsel undeutlich. Ist also eine Filtrirung nothwendig, dann misst man vorher die ganze Menge der wässerigen Indigodisulfosäurelösung und filtrirt durch ein trockenes Filtrum, wonach man einen abgemessenen Theil des Filtrats titirt. Hierbei ist jedoch eine Fehlerquelle zu erwähnen. Das zuerst durchgelaufene Filtrat enthält einen geringeren Procentgehalt an Indigo als die ganze Lösung: nicht nur sättigt sich das trockene Filtrum mit der Lösung, es wird zugleich auch Indigo der Lösung entzogen und im Filtrum festgelegt. Es ist daher nothwendig, dass man ein kleines Filtrum benutzt und die zuerst durchgelaufenen 20—30-cem. Filtrat unbenutzt lässt.

Bisweilen kommt es vor, dass sich gegen Ende der Titration äusserst fein vertheiltes Mangandioxyd in der Flüssigkeit abscheidet, wodurch Störung von zweierlei Art entsteht. Erstens wird der Sauerstoff des Kaliumpermanganats nicht in genügendem Maasse für die Oxydation des Indigos verbraucht: zweitens bekommt die Flüssigkeit eine braune Nüance, wodurch die genaue Bestimmung des Augenblicks, in welchem alles Indigorothe verschwunden ist, behindert wird. Dieser Uebelstand ist zu beseitigen, wenn man dann und wann während der Titration ein wenig starke Schwefelsäure zu der Flüssigkeit hinzufügt.

Selbstverständlich bekommt man auf diese Weise ein Quantum Indigo, doppelt so gross als dasjenige, welches das oxydirte Harnindoxyl geliefert haben würde, denn die eine Hälfte des Indigomoleküls wird vom Harnindican und die andere Hälfte vom Isatin geliefert.

Falls nun die Bestimmung des Harnindicans nach Wang (d. h. die Titrirung des reinen Indigoblau nach Waschung des Chloroformrückstandes mit Aetheralkoholwasser, wobei die rothbraunen Farbstoffe als Verunreinigungen aufgefasst und entfernt werden) die richtige Methode ist, dann muss der Ertrag an Indigoblau gleich der Hälfte des Ertrags an Indigorothe sein. Sind dagegen die von mir isolirten und als Indigo-

modifikationen aufgefassten braunen und rothen Farbstoffe wirklich Indigo, dann muss der Ertrag der gesamten Farbstoffe gleich der Hälfte des mittelst Isatinsalzsäure erhaltenen Indigoroths sein. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich vergleichende Bestimmungen gemacht von gleichen Mengen desselben Filtrats von mit Bleiessig gefälltem Harn, nach den folgenden drei verschiedenen Methoden behandelt:

a) Nach der ursprünglichen Methode Wang-Obermayer mit Ferrichloridsalzsäure, Oxydation während einer Stunde bei Zimmertemperatur und Erhitzen des Chloroformresiduums auf 110° während zweier Stunden.

b) Nach der Methode Wang mit Waschung des Chloroformresiduums mit Aetheralkoholwasser.

c) Nach der oben erwähnten Methode mit Isatinsalzsäure.

Die erhaltenen Farbstoffe wurden mit derselben Chamäleonlösung titrirt: für jede Bestimmung wurden 440 ccm. Filtrat entsprechend 400 ccm. Harn verarbeitet.

Die Ergebnisse von 8 Versuchsreihen sind folgende:

I.

- a) 3.56 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1.13 » Indigoblau,
- c) 7.76 » Indigoroht.

II.

- a) 4.90 mg Indigofarbstoffe,
- b) 2.55 » Indigoblau,
- c) 10.38 » Indigoroht.

III.

- a) 3.19 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1.53 » Indigoblau,
- c) 7.01 » Indigoroht.

IV.

- a) 3.45 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1.39 » Indigoblau,
- c) 8.00 » Indigoroht.

V.

- a) 3.50 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1.47 » Indigoblau,
- c) 7.80 » Indigoroht.

VI.

- a) 3.27 mg Indigofarbstoffe.
- b) 1.86 » Indigoblau.
- c) 7.51 » Indigoroth.

VII.

- a) 3.94 mg Indigofarbstoffe.
- b) 1.92 » Indigoblau.
- c) 8.72 » Indigoroth.

VIII.

- a) 2.25 mg Indigofarbstoffe.
- b) 1.66 » Indigoblau.
- c) 5.19 » Indigoroth.

Aus all diesen Versuchen geht hervor, dass der Ertrag an Indigoblau in keinem festen Verhältniss zum Ertrag an Indigoroth steht und viel weniger als die Hälfte beträgt. Indessen bleibt der Ertrag der gesammten Indigofarbstoffe etwas unter der Hälfte des Ertrags an Indigoroth, während letzterer gerade das Doppelte von ersterem sein müsste.

Beim Untersuchen der Ursache dieser Thatsache kommt in erster Reihe die Frage in Betracht, ob das Produkt, womit wir zu thun haben, reines Indigoroth ist oder nicht.

Zur Beantwortung dieser Frage habe ich die reducirende Kraft von Harnindigoroth verglichen mit der von Indigoroth von Bayer und von Indigoroth, das ich durch Sublimation im Vacuum daraus erhalten habe. In zweiter Reihe habe ich zu diesem Zwecke neben dem Harnindigoroth synthetisches Indigoroth von der Badischen Anilin- und Sodafabrik und sublimirtes Indigoroth von Bayer gewählt. Selbstverständlich wurden jedesmal die drei beisammen gehörigen Bestimmungen mit derselben Chamäleonlösung gemacht.

I.

- 5.2 mg subl. Indigoroth verbr. 18.8 ccm. Cham.
- 15.6 » Indigoroth Bayer verbr. **57.4** ccm. Cham. (5.2 : 15.6 = 18.8 : **56.4**).
- 18.5 » Harnindigoroth » **64.5** » » (5.2 : 18.5 = 18.8 : **66.9**).

Bei diesem Versuche hat also das Indigoroth von Bayer etwas mehr und das Harnindigoroth etwas weniger Chamäleon verbraucht als das sublimirte Indigoroth.

II.

5,4 mg synth. Indigorothe	verbr.	24,5 ccm. Cham.	
6,0 „ subl. Indigorothe Bayer	verbr.	26,8 ccm. Cham.	(5,4 : 6 = 24,5 : 27,2)
13,1 „ Harnindigorothe		56,7 „	(5,4 : 13,1 = 24,5 : 59,4)

Aus dieser zweiten Versuchsreihe geht hervor, dass das synthetische Indigorothe am meisten Chamäleon verbraucht hat; danach folgen sublimirtes Indigorothe von Bayer und Harnindigorothe.

Obige Zahlen zeigen unzweideutig, dass wir das mittelst Isatinsalzsäure aus Harn auf erwähntem Wege erhaltene Indigorothe als ein ziemlich reines Produkt anerkennen müssen. In zweiter Reihe kommt die Frage in Betracht, ob sich im mit Bleiessig gefällten Harn reducirende Bestandtheile befinden, welche Isatin zu Indigo umbilden können. Solche Stoffe sind Glucose, Isomaltose, Kreatinin, unter Umständen auch Lactose und Pentose. Was die Zuckerarten anbelangt, so sind diese bei saurer Reaction nicht im Stande, Isatin zu reduciren und ebensowenig das Kreatinin; von der Richtigkeit dieser Annahmen habe ich mich überzeugt.

Dass der Harn des Menschen ausser den Stoffen, welche sich zufolge den Fäulnisprocessen im Darne darin befinden, keine Bestandtheile enthält, welche bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure roth gefärbte, in Chloroform lösliche Stoffe entstehen lassen; ergibt sich aus der Untersuchung des Harnes von Neugeborenen, wozu Herr Professor Kouwer so freundlich war, mir die Gelegenheit zu bieten. In Uebereinstimmung mit demjenigen, was Senator schon vor vielen Jahren darüber mitgetheilt hat,<sup>1)</sup> fand ich in dem ersten Urinquantum, welches nach der Geburt entleert wurde, keine Spur von Indoxyl. Das Chloroform, womit der Harn nach Kochen mit Isatinsalzsäure geschüttelt wurde, nahm Isatin auf und färbte sich demzufolge etwas gelblich; jedoch von einer rothen Nüance zeigte es nicht die allergeringste Spur. Beim Fehlen von Indoxyl enthielt also der Harn keinen anderen Stoff, welcher mit Isatin Indigorothe bilden konnte. Einmal erhielt ich schon aus Harn,

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV. S. 3.

welcher am zweiten Tage nach der Geburt entleert war, ein wohl sehr schwach, aber doch deutlich roth gefärbtes Chloroformextract. Die Menge des Indoxyls war aber so gering, dass dieselbe mit dem Reagens von Obermayer nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Thatsache, dass der Ertrag an Indigo Roth etwas grösser ist als das Doppelte der gesammten Indigo Farbstoffe bei der Behandlung mit Ferrichloridsalzsäure, muss daher wahrscheinlich erklärt werden durch eine vollständigere Umbildung des Harnindoxyls in Indigo bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure.

Bevor ich die Besprechung der titrimetrischen Bestimmung des Harnindigo Roths beende, muss ich noch Folgendes bemerken:

Es wird jeder, der sich mit Indigobestimmungen beschäftigt hat, erfahren haben, dass Bestimmungen von Indigo mittelst Titration mit Chamäleon, welche auf Oxalsäure gestellt ist, nicht immer den theoretischen Verhältnissen entsprechen. Diese Thatsache muss schon Mohr nicht entgangen sein, da er diesbezüglich anführt: <sup>1)</sup> «Um eine solche Bestimmung auf absolutes Maass zurückzuführen, hat man die Beziehung der Chamäleonlösung auf reines Indigotin festzustellen. Vielleicht ist es zweckmässig, hier auch zu erwähnen, was die Badische Anilin- und Sodafabrik in dieser Beziehung anführt: <sup>2)</sup> Versuche haben indessen gezeigt, dass diese Berechnungen, wenn sie auch theoretisch vollkommen richtig sind, den thatsächlichen Verhältnissen nicht immer entsprechen und Irrthümer verursachen können. Die Oxydation verläuft augenscheinlich nicht unter allen Umständen quantitativ nach der angeführten Gleichung. Es ist das einzig Richtige, die Beziehung auf Oxalsäure ganz fallen zu lassen und das Chamäleon auf chemisch reines Indigo einzustellen, das Indigo also mit sich selber zu messen.»

Durch diese Mittheilungen und durch eigene Erfahrung

1) Lehrb. d. chem.-anal. titr. Meth. 1886, S. 800.

2) Ueber Indigorein. B. A. u. S. F. 1899, S. 15 u. 16.

veranlasst, habe ich bei Bestimmungen der absoluten Menge des Indigo meine Chamäleonlösungen auf das chemisch reine synthetische Produkt der Badischen Anilin- und Sodafabrik gestellt.

Alle Arten von Indigoroth, welche ich aus verschiedenen Bezugsquellen erhielt, enthalten mehr oder weniger andere Indigomodifikationen. So konnte ich aus dem Indigoroth von Bayer, nach Lösung in Chloroform und Verdunsten desselben, das reine Roth mittelst Aether von dem Residuum abspülen: der Belag zeigte jetzt die Farbe des Indigobrauns, welches sich in Alkohol löste, wonach etwas Indigoblau auf der Schale zurückblieb. Auch das synthetische Indigoroth von der Badischen Anilin- und Sodafabrik enthält etwas Blau, sodass ich mir das reine synthetische Roth verschaffte durch Abspülen des Chloroformrückstandes mit Aether.

Ich muss jetzt noch zurückkommen auf die colorimetrische Bestimmung des Harnindicans als Indigoroth für die klinische Untersuchung. Eine klinische Bestimmungsmethode muss, um praktisch verwendbar zu sein, einfach, bequem und schnell ausführbar sein, bei möglichst grosser Genauigkeit. Zu diesem Zwecke habe ich einen Indicanurometer zusammengestellt, welcher aus 11 in einer Reihe geordneten Reagensröhrchen von gleichem Durchmesser und gleicher Wanddicke besteht. Sechs dieser Röhrchen enthalten eine Lösung von aus Harn bereitetem Indigoroth in Chloroform von verschiedener Stärke, welche der Reihe nach übereinstimmt mit einem Gehalt des Harns an Indigo von 5, 10, 15, 20, 30, 40 mg per Liter.

Diese Röhrchen sind auf folgende Weise angefertigt:

Indigoroth, nach oben erwähnter Methode so rein wie möglich aus Harn bereitet, wurde in Chloroform gelöst. Von einem Theil dieser Lösung wurde das Chloroform verdunstet und der Gehalt an Indigo bestimmt mittelst Titration mit Chamäleon, welche auf reines synthetisches Indigoroth gestellt war. Vom anderen Theil der Lösung des Indigoroths wurden durch geeignete Verdünnung Flüssigkeiten bereitet, welche der Reihe nach 10, 20, 30, 40, 60 und 80 mg Indigo enthielten auf 1 Liter Chloroform. Diese Flüssigkeiten wurden als

Standardlösungen gebraucht, mit deren Hilfe auf colorimetrischem Wege eine beliebige Anzahl Röhren mit Indigoroth in Chloroform von bekannter Stärke angefertigt werden konnten. Diese Röhren wurden danach zugeschmolzen und konnten jetzt gebraucht werden, um durch Vergleichung der Farbe die Quantität Indigo zu bestimmen in Chloroform, womit der zu untersuchende Harn, nach dem kochen mit Isatinsalzsäure ausgeschüttelt war.

Im Apparat ist zwischen je zwei Standardröhren Raum offen gelassen für das Hinstellen eines Proberöhrchens, um die Farbenvergleichung zu erleichtern.

Wenn nun bei jedem Versuch das Volumen des Chloroforms, worin das Indigoroth gelöst wird, gleich gross genommen wird, wie das Volumen des für den Versuch gebrauchten Harns, so kann sofort aus der Intensität der Farbe des Chloroforms der Gehalt des Harns an Indican bestimmt werden, wobei jedoch zu bemerken ist, dass das vom Indoxyl herrührende Indigo die Hälfte beträgt des im Chloroform aufgenommenen Quantum. Ein Chloroformextract von gleicher Farbenintensität als ein Standardröhren, welches Chloroform enthält, mit 10 mg Indigoroth per Liter bedeutet also, dass der untersuchte Harn soviel Indican enthält, als 5 mg Indigo entspricht. Ein solcher Harn liefert ja doch mit Isatin 10 mg Indigo.

Zur Erleichterung der Untersuchung ist auf dem Standardröhren nicht der wirkliche Gehalt an Indigo, sondern die Hälfte davon angegeben. Man liest also auf dem Standardröhren, welches mit dem untersuchten am meisten in Farbe übereinstimmt, unmittelbar die Quantität Indigo ab, welche dem Quantum Indican in 1 Liter des untersuchten Harns entspricht.

Die Bestimmung wird nun auf folgende Weise ausgeführt. Ein gewisses Quantum des zu untersuchenden Harns (z. B. 20 ccm.) wird mit  $\frac{1}{10}$  seines Volumens an Bleiessig gefällt und durch ein trockenes Filtrum filtrirt. Vom klaren Filtrat giesst man  $5\frac{1}{2}$  ccm. (entsprechend 5 ccm. Harn) in ein Proberöhrchen und fügt eine Lösung von 20 mg Isatin auf 1 Liter starke Salzsäure hinzu. Wenn der Harn nicht

mehr Indoxyl enthält, als mit 20 mg Indigo übereinstimmt, ist ein Quantum von 5 ccm. Reagens ausreichend. Da jedoch ein Ueberschuss von Salzsäure und von Isatin hier nicht schadet, ist es besser, zur Vermeidung der Gefahr, dass ein grösserer Indoxylgehalt sich der Beobachtung entzieht, zu 5 $\frac{1}{2}$  ccm. Filtrat 10 ccm. Isatinsalzsäure zu fügen. Wenn das Quantum des erhaltenen Indigos ausserordentlich gross ist, kann man immer noch den Versuch mit dem Filtrat, nach Verdünnung mit einer gemessenen Quantität Wasser, wiederholen. Man erhitzt nun die Mischung von Filtrat und Reagens bis zur Siedehitze und kocht noch einige Secunden, wonach man das Röhrchen abkühlt und den Inhalt tüchtig ausschüttelt mit 5 ccm. Chloroform. Das gebildete Indigoroth wird vom Chloroform aufgenommen und es ist, wenn man das Proberöhrchen in die Reihe der Standardröhrchen hinstellt, nicht schwer zu bestimmen, mit welchem davon es in Farbenintensität am meisten übereinstimmt.

Einige Male habe ich die auf diese Weise gemachte colorimetrische Bestimmung kontrollirt durch Titration des aus 300 oder 400 ccm. desselben Harns bereiteten Indigoroth.

Die Ergebnisse waren:

Colorimetrisch:	Titrimetrisch:
I. Zwischen 5 und 10 mg	7,6 mg
II. „ 30 „ 40 „	33,0 „
III. Etwas über 30 mg	32,5 „

Auf den Proberöhrchen sind im Interesse der Zeitersparniss Theilstriche angebracht bei 5 $\frac{1}{2}$ , 15 $\frac{1}{2}$  und 20 $\frac{1}{2}$  ccm., übereinstimmend mit den nacheinander anzuwendenden Flüssigkeitsmengen. Lässt man das Filtrat des mit Bleiessig gefällten Harns sofort in ein Proberöhrchen laufen und führt man die weitere Behandlung so, wie ich erwähnt habe, aus, dann nimmt diese Bestimmung nur einige Minuten in Anspruch. Das Fällen des Harns mit Bleiessig, welches von so grosser Wichtigkeit ist bei der titrimetrischen Bestimmung für die Entfernung von störenden und reducirenden Stoffen, ist auch für diese colorimetrische Methode sehr zu empfehlen, da man hierdurch die Bildung eines Magmas beim Ausschütteln mit Chloroform ver-

hütet und das klare Chloroformextract sofort colorimetrisch beurtheilen kann.

Verdünnung des Filtrats mit Wasser ist bei sehr starker Indicanurie zu empfehlen, um zu verhüten, dass sich krystalinisches Indigoroth absetzt, das nicht leicht in das Chloroform übergeht.

Für die Bereitung meiner Isatinsalzsäurelösung habe ich Isatin von Merck benutzt; die Salzsäure muss chemisch rein sein, da bei geringer Verunreinigung mit Eisen die rothe Reaction sich mit der Reaction von Stokvis mischt und das Chloroform eine violette Farbe annimmt.

Das Isatinsalzsäurereagens muss jeden Monat frisch bereitet werden.

Endlich muss ich noch darauf aufmerksam machen, dass Harn, der nicht frisch ist, bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure neben Indigoroth etwas Blau liefern kann. Dasselbe habe ich bei dem frisch entleerten Harn eines Patienten, der an Cystitis litt, beobachtet. In diesem Falle reagierte der Harn in Folge der Wirkung von Bacterien alkalisch.

Es ist nöthig, zum Erhalten der richtigen Farbe, die Standardröhrchen im Dunkeln aufzubewahren.