

## Zur Methodik der Indicanbestimmung im Harn.

Von  
**Alexander Ellinger.**

---

Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und  
experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.

(Der Redaktion zugegangen am 16. April 1903.)

Obwohl Jaffe<sup>1)</sup> bereits im Jahre 1870 eine Methode, das Harnindican quantitativ zu bestimmen, veröffentlicht hat, haben doch bis auf die allerletzten Jahre diejenigen Forscher, welche sich mit der Indicanfrage beschäftigt haben, sich zumeist damit begnügt, die mehr oder weniger reichliche Ausscheidung des Indicans unter pathologischen Verhältnissen oder im Tierexperiment gesetzten Bedingungen nach dem Ausfall qualitativer Proben zu beurteilen. Der Grund dafür liegt auf der Hand: Die Methode Jaffes ist nach seiner eigenen Aussage umständlich und zeitraubend, wenn es sich um den Menschenharn handelt, sie erfordert zur richtigen Ausführung Übung in der Bemessung des Zusatzes von Chlorkalk. Sie wird auch, was die Genauigkeit der Werte angeht, von dem Autor selbst nur als ein erster Versuch einer quantitativen Indicanbestimmung bezeichnet.

Es hat denn auch an Bemühungen nicht gefehlt, die Jaffesche Methode zu vereinfachen. Während Jaffe den durch Einwirkung von Chlorkalklösung und konzentrierte Salzsäure aus dem Indican gebildeten Indigo gewichtsanalytisch bestimmte, benutzte Salkowski<sup>2)</sup> zuerst eine kolorimetrische Methode, indem er nach Stockvis<sup>3)</sup> Vorgang den Indigo mit Chloroform

1) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., III., 448, 1870.

2) Virchows Archiv für path. Anat., Bd. 68 S. 407, 1876.

3) Chem. Centralbl. 1871, 36.

ausschüttelte und die Farbe der Chloroformlösung mit Indigo-  
lösungen von bekanntem Gehalt verglich.

Noch exakter stellte Fr. Müller<sup>1)</sup> den Indigogehalt der  
in gleicher Weise gewonnenen Chloroformlösungen auf spektro-  
photometrischem Wege im Anschluß an die von Vierordt<sup>2)</sup>  
und Krüss<sup>3)</sup> ausgearbeitete Methodik der quantitativen Spektral-  
analyse fest.

Die genannten Autoren bedienten sich sämtlich der  
Chlorkalklösung als Oxydationsmittel. Dieses Reagens hat,  
wie Jaffé ausführlich auseinandergesetzt hat, den Nachteil,  
daß für jede einzelne Bestimmung das Optimum des Chlor-  
zusatzes erst zu ermitteln ist, wenn man Verluste entweder  
durch eine unzureichende Überführung des Indicans in Indigo  
oder durch eine weitergehende Zerstörung des Indigos ver-  
meiden will. Freilich hat diese Notwendigkeit auch ihren  
Vorzug. Man gewinnt schon durch die vorbereitende Manipu-  
lation einen ungefähren Anhaltspunkt für die vorhandene  
Indicanmenge, wenn auch der Chlorkalkzusatz sich für eine  
titrimetrische Bestimmung nicht verwerten läßt. Es scheint  
nötig, darauf besonders hinzuweisen, weil, obwohl Jaffe diese  
Frage bereits diskutiert hat, nach etwa 30 Jahren Wolowski,<sup>4)</sup>  
ohne sich um die erhobenen Bedenken zu kümmern, eine  
solche Methode empfohlen hat.

Es war jedenfalls als ein Fortschritt zu begrüßen, als  
Obermayer<sup>5)</sup> im Jahre 1890 das Eisenchlorid in die Praxis der  
Indicanbestimmung als Reagens einführte, welches Baumann<sup>6)</sup>  
bereits als bestes Oxydationsmittel der Indoxylschwefelsäure  
empfohlen hatte. Obermayer gab zunächst in einer kurzen  
Mitteilung nur seine bekannte qualitative Probe an, stellte

1) Mitteilungen a. d. med. Klinik zu Würzburg II S. 341, Wies-  
baden, 1886.

2) Zeitschrift f. Biologie X, 21 u. 399, 1874 und ebenda XII,  
187, 1875.

3) G. und H. Krüss. Kolorimetrie und quantitative Spektralanalyse,  
Hamburg und Leipzig, 1891.

4) Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 2.

5) Wiener klin. Wochenschrift 1890, S. 176.

6) Ber. der deutsch. chem. Ges. XII, 1098, 1879.

aber sofort die Ausarbeitung einer quantitativen Methode in Aussicht. Die Veröffentlichung<sup>1)</sup> derselben erfolgte erst acht Jahre später ungefähr gleichzeitig mit derjenigen Wangs.<sup>2)</sup> Das Prinzip beider Autoren ist genau das gleiche: Fällung des Harns mit Bleizuckerlösung. Überführung des Indicans im Filtrat in Indigo durch Zusatz der gleichen Menge des Obermayer'schen Reagens (rauchende Salzsäure, welche im Liter 2—4 g festes Eisenchlorid enthält), Ausschüttelung des Indigos mit Chloroform, Abdestillieren des Chloroforms, Lösen des Rückstandes in konzentrierter Schwefelsäure und Titration der Indigotinsulfosäure mit stark verdünnter Kaliumpermanganatlösung.

Die Abänderungen der qualitativen Indicanprobe, welche in den letzten Jahren vorgeschlagen wurden, scheinen mir keinem Bedürfnis zu entsprechen. Die verschiedensten Oxydationsmittel sind zur Überführung in Indigo verwandt worden: Wasserstoffsperoxyd (Loubiou),<sup>3)</sup> Persulfate (Amann),<sup>4)</sup> Kaliumchlorat (Stryzowski<sup>5)</sup>: statt des Obermayer'schen Reagens hat Graziani<sup>6)</sup> eine Mischung von 2 Tropfen Liquor ferri sesquichlorati in 50 ccm konz. Schwefelsäure empfohlen. Eine quantitative Methode ist auf keine dieser Reaktionen begründet worden.

Prinzipiell von allen angeführten verschieden ist die Art des Nachweises und der Bestimmung des Indicans, welche Boumra<sup>7)</sup> jüngst in Vorschlag gebracht hat. Er benutzt die Kondensation des Indoxyls mit Isatin zu Indigrot zu einer titrimetrischen oder colorimetrischen Bestimmungsmethode des Indicans, auf welche ich noch zurückkommen werde.

Zur Orientierung für klinische Zwecke hat endlich Strauss<sup>8)</sup>

1) Wiener klin. Rundschau 1898, S. 537, cit. nach Malys Jahresbericht, Bd. 28, S. 310 und Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 427.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXV, S. 406, 1898, Bd. XXVII, S. 135, 1899.

3) citiert n. Chem. Ctrbl., 1897, I, 620.

4) citiert n. Chem. Ctrbl., 1898, I, 152.

5) citiert n. Chem. Ctrbl., 1901, H, 1181.

6) citiert n. Malys Jahresbericht, 1898, S. 276.

7) Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 82, 1901.

8) Deutsche med. Wochenschr., 1902, No. 16.

im vorigen Jahre einen kleinen Apparat zur kolorimetrischen Bestimmung des mit Obermayerschem Reagens erhaltenen Indigos in Chloroformlösung angegeben.

In ausgedehntem Maße zur Anwendung gekommen ist von allen empfohlenen quantitativen Methoden, soweit aus der Literatur ersichtlich ist, nur die Wangsche, und auch diese hat nur ihr Autor selbst zu systematischen Untersuchungen benutzt, deren Resultate er in einer in norwegischer Sprache erschienenen Monographie<sup>1)</sup> niedergelegt hat.

War somit von Wang der Beweis erbracht, daß seine Methode nicht zu umständlich war, um große Versuchsreihen damit vorzunehmen, so mußten die Veränderungen, die er selbst im Laufe seiner Untersuchungen an der Methode vornahm, sowie die Diskussionen, welche in dieser Zeitschrift über dieselbe namentlich zwischen Wang<sup>2)</sup> und Bouma<sup>3)</sup> geführt wurden, Bedenken gegen deren Genauigkeit aufkommen und ihre Nachprüfung wünschenswert erscheinen lassen.

Daß diese Bedenken von kompetenter Seite geteilt werden, beweist das Urteil Thierfelders in seiner neuesten Auflage von Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse:

«Trotz verschiedener Bemühungen hat diese Methode in ihren Einzelheiten noch nicht genügend festgestellt werden können.»

Ich habe deshalb, als im hiesigen pharmakologischen Institute zur Entscheidung der gegenwärtig in der Indicanfrage vorzugsweise diskutierten Streitpunkte zahlreiche quantitative Bestimmungen sich als nötig erwiesen, die Methode von Wang und Obermayer auf eine gesicherte Grundlage zu stellen und zugleich etwas zu vereinfachen gesucht.

Bei jeder analytischen Methode gilt es als eine selbstverständliche Forderung, sie an reinem Materiale zu kontrollieren. Für keine Indicanbestimmung aber ist bisher diese Forderung erfüllt. Obermayer beschränkte sich seiner Zeit zur Empfehlung

1) Om Indicanuri. Christiania 1900.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXVIII, S. 576, 1899.

3) Diese Zeitschr. Bd. XXVII, S. 348, 1899 und Bd. XXX, S. 117, 1900.

des Eisenchlorids als Oxydationsmittel auf die Bemerkung: «Von demselben ist es schon lange bekannt, daß es indoxylschwefelsaures Kalium bei Gegenwart von Salzsäure quantitativ in Indigoblau überführt. Zur Stütze dieser Behauptung habe ich in der Literatur nur eine kurze Notiz von Baumann und Tiemann<sup>1)</sup> gefunden, wonach bei Anwendung dieses Oxydationsmittels reines indoxylschwefelsaures Kalium, statt der berechneten 52<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 46<sup>o</sup>/<sub>o</sub> Indigo geliefert habe, d. h. also 88,5<sup>o</sup>/<sub>o</sub> der theoretischen Menge. Leider fehlt eine Angabe über die genaueren Versuchsbedingungen wie Menge der angewandten Salzsäure, des zugesetzten Eisenchlorids, über die Temperatur, bei welcher die Spaltung vor sich ging u. s. w. Es ist aber durchaus erforderlich, unter genau gleichen Bedingungen mit den Indicanlösungen wie mit dem Harn zu arbeiten, wenn die Methode kontrolliert werden soll.

#### Versuche mit reinen Indicanlösungen.

Das indoxylschwefelsaure Kalium wurde aus dem Harn eines ca. 25 kg schweren Hundes dargestellt. Der Hund erhielt an drei aufeinander folgenden Tagen je 2 g reines Indol, welches durch Fäulnis von Fibrin nach E. & H. Salkowski<sup>2)</sup> erhalten war, zu seinem aus 1 kg Pferdefleisch bestehenden Futter. Zur Gewinnung des reinen Indicans hielt ich mich im wesentlichen an das Verfahren von G. Hoppe-Seyler.<sup>3)</sup> Eine Abänderung erwies sich nur in einem Punkte notwendig: Die nach Hoppe-Seylers Vorschrift gereinigten farblosen Krystalle, welche aus den letzten alkoholischen Auszügen auskrystallisierten oder durch Ätherfällung erhalten wurden, zeigten noch starke Verunreinigungen von oxalsaurem Kalium, welche durch wiederholtes Umkrystallisieren sich nicht entfernen ließen. Sie wurden deshalb in wenig Wasser gelöst und durch Erhitzen mit einem Überschuß von Kalkwasser wurde die Oxalsäure ausgefällt. Das Filtrat vom Calciumoxalat wurde

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. XII, 1098, 1879 und XIII, 415, 1880.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. VIII, S. 462, 1884.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr., Bd. VII, S. 423, 1883.

mit Kohlensäure gesättigt, das gebildete  $\text{CaCO}_3$  abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft und der Rückstand zur Trennung vom gebildeten  $\text{K}_2\text{CO}_3$  mehrfach mit Alkohol extrahiert. Aus der eingeeengten alkoholischen Lösung schied sich dann das indoxylschwefelsaure Kalium in prachtvoll glänzenden Blättchen ab, welche durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Alkohol leicht analysenrein erhalten wurden. Mit Rücksicht auf die Kostbarkeit des Materials beschränkte ich mich auf eine Schwefelsäurebestimmung zur Kontrolle der Reinheit.

$\text{SO}_4$ : gefunden 38,47 % . . . berechnet 38,2 % . . .

Um in Verdünnungen zu arbeiten, welche denjenigen der Harnanalysen entsprechen, stellte ich zwei Lösungen her.

Lösung A enthielt in 10 ccm 93,1 mg Indican.

Lösung B wurde durch Verdünnung von 5 ccm der Lösung A auf 100 ccm erhalten, enthielt also in 1 ccm 0,4655 mg Indican.

#### Versuch I.

Zu 10 ccm der Lösung B wurden 40 ccm Wasser und 50 ccm Obermayers Reagens zugesetzt: die Mischung wurde im Scheidetrichter mit Chloroform ausgeschüttelt, bis das Chloroform farblos blieb, wozu 3 Ausschüttelungen genügten. Die abgelassene Chloroformlösung wurde durch ein trockenes Filter in einen Kolben gegossen, das Chloroform auf dem Wasserbade abdestilliert, der Rückstand ebenda noch 5 bis 10 Minuten lang getrocknet, indem der Kolben offen auf das Wasserbad mit seitwärts geneigtem Halse gelegt wurde. Der Rückstand wurde zweimal mit heißem Wasser gewaschen. Das erste Washwasser erschien goldgelb gefärbt, das zweite farblos. Der Rückstand wurde in etwa 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure gelöst und noch etwa 5 Minuten mit derselben auf dem Wasserbade erwärmt. Die klare blaue Lösung wurde in etwa 50—100 ccm destilliertes Wasser gegossen, das Kölbchen mit Wasser nachgespült und das Spülwasser mit der übrigen Sulfosäurelösung vereinigt. Die Titration wurde in einem Erlenmeyer-Kolben vorgenommen, der vorsichtshalber zuvor mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat gereinigt war.

Die benutzte Chamäleonlösung war nach der Vorschrift von Wang hergestellt. Die Stammlösung enthielt ca. 3 g  $\text{KMnO}_4$  im Liter, die verdünnte Lösung 5 ccm der Stammlösung in 200 ccm. Sie war auf reine Indigotinsulfosäurelösung, welche durch Auflösen von «Indigorein» der badischen Anilin- und Sodafabrik erhalten wurde,<sup>1)</sup> eingestellt. 1 ccm der verdünnten Lösung entsprach 0,177 mg Indigo, wie aus zahlreichen scharf übereinstimmenden Bestimmungen ermittelt wurde.

Die Titration ergab einen Verbrauch von 11,5 ccm Chamäleonlösung.

Gef. 2,04 mg Indigo, ber. 2,43, d. h. 83,96 % der theoretischen Menge.

### Versuch II.

10 ccm der Lösung B wurden ohne Verdünnung mit dem gleichen Volumen Obermayers Reagens versetzt und genau wie in Versuch I behandelt.

Verbrauch: 12,0 ccm Chamäleonlösung.

Gef. 2,12 mg Indigo, ber. 2,43, d. h. 87,41 % der theoretischen Menge.

### Versuch III.

10 ccm der Lösung B wurden auf 100 ccm verdünnt, mit 100 ccm Obermayers Reagens versetzt und wie oben behandelt.

Verbrauch: 11,5 ccm Chamäleonlösung.

Gef. 2,04 mg Indigo, ber. 2,43, d. h. 83,96 % der theoretischen Menge.

Die drei Bestimmungen zeigen, daß die Verdünnungen der Indicanlösung bzw. der Überschub an Obermayers Reagens ohne wesentlichen Einfluß auf das Resultat sind. Die Differenz zwischen dem Resultate des Versuchs II und dem der Versuche I und III liegt noch nahezu in den Grenzen der Versuchsfehler.

Dagegen bedingt der Überschub an Obermayers Reagens sehr erhebliche Verluste an Indigo, wenn der gebildete Indigo nicht sofort der weiteren Einwirkung entzogen wird. Davon liefern die folgenden gewichtsanalytischen Bestimmungen ein anschauliches Bild.

<sup>1)</sup> Für die dem Laboratorium freundlichst zur Verfügung gestellten Präparate sei der Direktion der Fabrik auch an dieser Stelle wärmster Dank ausgesprochen.

## Versuch IV.

1 ccm der Lösung A wurde in 30 ccm Wasser gelöst und mit 5 ccm Obermayers Reagens 5 Minuten lang gekocht. Der gebildete Indigo schied sich schnell flockig ab und wurde alsbald in einen Goochtiiegel mit Asbesteinlage, welche vorher mit konzentrierter Salzsäure und konzentrierter Schwefelsäure gründlich ausgewaschen war, abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen.

Gef. 4,4 mg Indigo, ber. 4,86, d. h. 90,5% der theoretischen Menge.

## Versuch V.

0,1213 g Indican, in 15 ccm Wasser gelöst, wurden mit 15 ccm Obermayers Reagens auf dem Wasserbade eine halbe Stunde erhitzt, nach 16stündigem Stehen abfiltriert und wie in Versuch IV behandelt.

Gef. 47,5 mg, ber. 62,3 mg Indigo, d. h. 76,24% der theoretischen Menge.

## Versuch VI.

40 ccm der Lösung B wurden mit 40 ccm Obermayers Reagens zweimal 24 Stunden stehen gelassen ohne Erwärmen und wie oben behandelt.

Gef. 6,4 mg, ber. 9,72 mg Indigo, d. h. 65,8% der theoretischen Menge.

Eine Versuchsreihe wurde weiterhin mit reinen Indoxyl-lösungen angestellt, welche aus einem uns von der Badischen Anilin- und Sodafabrik gütigst zugesandten Indoxylsäurepräparate nach den Angaben von Vorländer und Drescher<sup>1)</sup> dargestellt waren. Auch hier zeigte es sich, daß längeres Stehen mit einem Ueberschuß von Obermayers Reagens sehr erhebliche Verluste im Vergleich zu derjenigen Indigomenge bedingt, welche durch Einblasen von Luft in die alkalisch gemachte Indoxyllösung gewonnen werden kann, daß dagegen die Verluste nur gering sind, wenn man den gebildeten Indigo sofort durch Ausschütteln mit Chloroform der weiteren Einwirkung des Reagens entzieht.

Wodurch ist nun der Verlust an Indigo bei den Kontroll-

<sup>1)</sup> Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 34., S. 1854, 1901.



versuchen mit reinem Indican, der in dem Versuch von Baumann und Tiemann und in meinen Versuchen nahezu die gleiche Höhe erreichte, bedingt? Zum großen Teile jedenfalls durch eine Überoxydation des Indoxyls zu Isatin. Ich konnte selbst bei Anwendung von einigen Centigrammen Indican in dem Waschwasser des Chloroformrückstandes regelmäßig Isatin mittels der Indopheninprobe (Blaufärbung des in konzentrierter Schwefelsäure gelösten Rückstandes beim Schütteln mit thiophenhaltigem Benzol) nachweisen. Wurden größere Mengen Waschwasser von den Chloroformrückständen indicanreicher Harnen eingedampft, so ließen sich, wie hier vorgehend bemerkt sei, durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser wohl ausgebildete Kryställchen vom Aussehen des Isatins erhalten, die mit salzsaurem Phenylhydrazin das charakteristische Isatinphenylhydrazon lieferten. Nach dem positiven Ausfall der Indopheninprobe bei den Versuchen mit reinem Indican ist wohl die Annahme gerechtfertigt, daß auch das Isatin, welches bei den Harnausschüttelungen gewonnen wurde, mindestens zum großen Teil durch Oxydation der Indoxylschwefelsäure erhalten wurde und nicht etwa im Harn präformiert war. Es findet sich übrigens in der Literatur bereits eine Angabe von Margary,<sup>1)</sup> daß auch Indigoblau selbst unter der Einwirkung von Eisenoxydsalzen weiter oxydiert wird.

Der Nachweis des Isatins bei der Einwirkung von Obermayers Reagens auf indoxylschwefelsaures Kalium macht auch das regelmäßige Auftreten von Indigorot bei den Indicanbestimmungen begreiflich, da bekanntlich diese Modifikation des Indigos regelmäßig beim Zusammentreffen von Indoxyl und Isatin in salzsaurer Lösung auftritt. Ich habe das Auftreten von Indigorot bei der Einwirkung von Obermayers Reagens auf reine Indicanlösungen niemals vermißt. Wenn man den entstandenen Indigoniederschlag mit kaltem Alkohol oder Äther auszieht, so erhält man schön rote Lösungen, welche nach Abdunsten des Lösungsmittels einen krystallinischen Farbstoff zurücklassen, deren Färbung also wohl durch Indigorot und nicht

<sup>1)</sup> Gazzetta chim. ital., Bd. 13, S. 375, 1883.

etwa durch das von Baeyer<sup>1)</sup> und Baumann<sup>2)</sup> beschriebene amorphe Säurekondensationsprodukt des Indoxyls bedingt ist. Wenn überhaupt, so entsteht dieser wenig scharf charakterisierte Körper bei der Einwirkung von Obermayers Reagens auf Indican, wie auch Baumann schon angegeben hat, höchstens in Spuren.

Durch die regelmäßige Beobachtung der Bildung von Indigorot aus reinen Indicanlösungen scheint mir der Streit zwischen Wang und Bouma über die Berechtigung des Auswaschens der Chloroformrückstände mit Alkohol oder Ätheralkoholwasser prinzipiell zugunsten Boumas entschieden. Obermayer und Wang haben die Notwendigkeit des Auswaschens betont, um zu reinen Indigoblaulösungen zu gelangen, Bouma hat dagegen angeführt, daß man mit diesen Reinigungsmitteln Indigofarbstoffe entfernt, welche aus dem Indican entstanden seien, und daß man also Verluste erleiden müsse. Die oben angeführten Versuche haben nicht nur den Beweis erbracht, daß Indigorot entsteht, sondern auch gezeigt, warum die Bildung dieser Modifikation zu erwarten ist.

Daß neben der erwähnten Entstehung des Indigorots aus Indoxyl und Isatin auch Indigoblau in Indigorot unter den Bedingungen der Indicanbestimmung übergehen kann, wie Bouma annimmt, soll nicht bestritten werden. Wenn auch Wang darin recht haben mag, daß absolut reines Indigoblau beim Erwärmen in Chloroformlösung seine Farbe nicht verändert, so genügen doch minimalste Beimischungen anderer Substanzen, um eine Farbenveränderung hervorzurufen. Selbst solche Lösungen von reinem Indigoblau, welche ihren rein blauen Ton auf dem Wasserbade bewahrten, nahmen eine rotviolette Färbung an, wenn sie vorher mit Obermayerschem Reagens geschüttelt waren.

Ob die von Bouma geäußerte Anschauung richtig ist, daß die beobachtete Umwandlung von Indigoblau in Indigorot auf Depolymerisation beruht, vermag ich nicht zu entscheiden.

1) Ber. der deutschen chem. Ges., Bd. 14, S. 1744, 1881.

2) l. c.

Die von ihm zum Beweis seiner Ansicht angestellten Experimente scheinen mir nicht einwandfrei. Bouma erhielt weniger Indigoblau, wenn er Harn längere Zeit bei niedriger Temperatur, als wenn er ihn 10—15 Minuten bei Zimmertemperatur oder bei 45° mit Obermayers Reagens stehen ließ. Er nahm an, daß bei niedriger Temperatur mehr von der kleineren Molekel (Indigorot) entstehe, und bezog die Verluste ausschließlich auf die Bildung von Indigorot und Indigobraun, welche er durch Auswaschen mit Alkohol und Äther entfernte.

Wang hat mit Recht dem gegenüber geltend gemacht, daß die Ausbeute an Indigo durch die längere Dauer der Einwirkung von Obermayers Reagens beeinflußt wird, und auf die Möglichkeit hingewiesen, daß eine weitergehende Oxydation des Indoxyls schuld daran sei. Meine Versuche über den Einfluß der Dauer der Einwirkung von Obermayers Reagens auf die aus reinem Indican entstehende Indigomenge stützen die Vermutung Wangs.<sup>1)</sup>

Für die Methodik der Indicanbestimmung folgt aus dem Gesagten, daß man sofort nach Zusatz des Obermayerschen Reagens ausschütteln soll, daß aber das Auswaschen des Chloroformrückstandes nach Wang und Obermayer wegen der Löslichkeit des stets entstehenden Indigorots in den vorgeschlagenen Reinigungsmitteln, von welcher ich mich wiederholt überzeugt habe, zu vermeiden ist.

Notwendig ist dagegen das Auswaschen des Chloroformrückstandes mit heißem Wasser, um das gebildete Isatin zu entfernen. Zwar wird mit dem Auswaschen desselben ebenfalls ein Oxydationsprodukt des Indoxyls der Titration entzogen. Aber seine Anwesenheit würde den Verbrauch an Kaliumpermanganat in schwer kontrollierbarer Weise ver-

<sup>1)</sup> Wenn Bouma in seiner zweiten Mitteilung *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, Bd. XXX, S. 117 über Versuche berichtet, in welchen sofortiges Ausschütteln einen Verlust an Indigo zur Folge hatte, so kann ich diese Erfahrung nicht bestätigen. Niemals ließ sich nach längerem Stehen nachträglich noch aus dem Gemisch von Harn und Reagens Indigo ausschütteln, wenn nicht etwa eine verdünntere Salzsäure zur Anwendung kam.

größern, während die Anwesenheit von Indigorot der titrimetrischen Bestimmung keine Schwierigkeiten in den Weg legt. Man muß dann nur als Endpunkt der Reaktion das Verschwinden des rötlichen Farbentons betrachten, welcher erst, nachdem die Flüssigkeit ihren grünen Ton verloren hat, deutlich in die Erscheinung tritt. Die Farbe geht dann in ein reines Gelb über, das sich auf weiteren Zusatz von Chamäleonlösung nicht mehr ändert.

#### **Kontrollversuche an Harn mit bekanntem Indicanzusatz**

Für die Bestimmungen im Harn waren hauptsächlich zwei Fragen zu erledigen: ob durch die Vorbehandlung des Harns mit Bleisalzlösungen kein Indican verloren wird und ob in dem mit heißem Wasser ausgewaschenen Chloroformrückstand nicht neben dem Indigo noch reduzierende Substanzen enthalten sind, welche das Resultat der Titration beeinflussen. Von bekannten normalen Harnbestandteilen kommen, wie auch Wang hervorhebt, hier Hippursäure und aus dieser abgespaltene Benzoësäure, Phenole und Oxysäuren in erster Linie in Betracht. Alle diese Substanzen sind in heißem Wasser so weit löslich, daß die minimalen Mengen, welche dem Indigo beigemischt sein können, leicht durch Auswaschen zu entfernen sind. Unter den angewandten Versuchsbedingungen scheint aber überhaupt außer dem Isatin kaum eine andere Beimengung ins Chloroform überzugehen. Wenigstens habe ich in dem Waschwasser selbst solcher Harns, welche an Fäulnisprodukten enorm reich waren — sie stammten von Hunden mit gegengeschalteten Dünndarmschlingen —, niemals eine deutliche Millonsche Reaktion bekommen, wenn die zur Analyse verarbeitete Harnmenge so gewählt war, daß 3—4maliges Ausschütteln mit Chloroform zur Aufnahme des gesamten Indigos genügte. Wenn zu große Harnmengen verarbeitet wurden, oder wenn in besonders zur Entscheidung dieser Frage angestellten Versuchen das Harngemisch stundenlang im Extraktionsapparat mit Chloroform ausgezogen wurde, gab das Waschwasser des Rückstandes eine starke Millonsche Reaktion.

Auf die richtige Wahl der Harnmenge ist also nicht nur aus Gründen der Bequemlichkeit Rücksicht zu nehmen, um das sehr langwierige Ausschütteln mit Chloroform zu vermeiden, welches notwendig wird, sobald sich Indigo in beträchtlicherer Menge krystallinisch abscheidet, sondern diese Wahl bedingt auch die Genauigkeit der Methode. Es empfiehlt sich deshalb, sobald man sieht, daß die in Arbeit genommene Harnportion zu viel Indigo enthält, die Bestimmung abzubrechen und eine neue mit einer kleineren Harnmenge vorzunehmen.

Als Fällungsmittel habe ich, dem Vorschlage von Bouma folgend, statt Bleizuckerlösung den Liquor plumbi subacetici verwandt. Zu 100 ccm Menschenharn wurden 10 ccm der Bleiessiglösung hinzugefügt, bei hoch konzentriertem Hundeharn (spez. Gewicht über 1040) wurde zuvor auf die Hälfte verdünnt. Die Verwendung von Bleiessig statt des von Wang und Obermayer empfohlenen Bleizuckers ist namentlich mit Rücksicht auf die Entfernung von solchen Substanzen zu empfehlen, welche nach Verabreichung von Arzneimitteln in den Harn gelangen. Für die Salicylursäure hat dies Bouma bereits ausgeführt.

Verluste an Indigo entstehen bei der Bleiessigfällung ebenso wenig wie bei der Bleizuckerfällung, vorausgesetzt, daß der Harn sauer reagiert. Mehrfach habe ich den sorgfältig mit Wasser ausgewaschenen Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff oder Schwefelsäure zersetzt und auf Indigo liefernde Substanzen geprüft. Es ließ sich niemals eine Spur davon nachweisen. Dagegen werden nachweisbar Indoxylverbindungen zurückgehalten, wenn ein stark ammoniakalischer Urin mit Bleiessig gefällt wird; Bleiessig und Ammoniak ist ja von Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> als Fällungsmittel für Indican angewandt worden.

Harne, welche nicht oder nicht mehr sauer reagieren, müssen deshalb vor der Bleiessigfällung mit Essigsäure schwach angesäuert werden.

<sup>1)</sup> Cit. nach Gorup-Besanez, Lehrb. d. physiol. Chemie, Braunschweig 1874.

Zu den Kontrollbestimmungen wurde normaler indicanarmer Harn von einem Menschen, der wenig Fleisch gegessen hatte, und von einem Hunde, der 14 Tage lang nur mit Brot und Mehlsuppe gefüttert war, verwandt.

In zwei gut übereinstimmenden Analysen wurde der Indicangehalt des Harns ermittelt, dann durch Zusatz reiner Indicanlösung Harn von wechselndem Gehalt hergestellt und in diesen wiederum in je zwei Bestimmungen die Indigomenge bestimmt.

### Kontrollbestimmung I.

#### Menschenharn.

Spez. Gew. 1012. — Reaktion sauer. — 250 ccm mit 25 ccm Bleiessig gefällt. Vom Filtrat verbrauchen 100 ccm 1.8 bzw. 1.6 ccm Chamäleonlösung, 100 ccm Harn verbrauchen 1.87 ccm, enthalten also 0.331 mg Indigo.

Zu 248 ccm dieses Harns werden 2 ccm der Indicanlösung A, d. h. 18,62 mg Indican zugefügt und mit 25 ccm Bleiessig gefällt.

100 ccm Filtrat verbrauchen 19,4 ccm bzw. 19,0 ccm, Mittel: 19,2 ccm Chamäleonlösung, Indicanzusatz in 100 ccm Filtrat:  $19,2 - 1,7 = 17,5$  ccm.

Indicanzusatz in 100 ccm Harn entspricht 19,25 ccm, d. h. 3,41 mg Indigo.

Ber. 3,89 mg, gef. 3,41 mg, d. h. 87,65 % der zugesetzten Menge.

### Kontrollbestimmung II.

#### Hundeharn.

Spez. Gewicht 1009. Reaktion sauer. Fällung wie oben.

100 ccm Filtrat verbrauchen in beiden Bestimmungen 1,4 ccm.

100 ccm Harn verbrauchen 1,54 ccm entsprechend 0,273 mg Indigo.

Zusatz von Indican wie in Versuch I.

100 ccm Filtrat verbrauchen 18,4 ccm bzw. 17,8 ccm, Mittel 18,1 ccm.

Indicanzusatz in 100 ccm Filtrat entspricht  $18,1 - 1,4 = 16,7$  ccm.

Indicanzusatz in 100 ccm Harn entspricht 18,37 ccm, d. h. 3,25 mg

Indigo.

Ber. 3,89 mg, gef. 3,25 mg, d. h. 83,84 % der zugesetzten Menge.

### Kontrollbestimmung III.

Zu 240 ccm desselben Hundeharns 10 ccm der Indicanlösung B, d. h. 4,655 mg Indican gesetzt.

100 ccm Filtrat verbrauchen 6,0 bzw. 5,8 ccm Chamäleonlösung.

Indicanzusatz in 100 ccm Filtrat entspricht  $5,9 - 1,4 = 4,5$  ccm.

Indicanzusatz in 250 cem Harn entspricht 12,38 cem, d. h. 2,19 mg Indigo.

Ber. 2,43 mg. gef. 2,19 mg. d. h. 90,17 % der zugesetzten Menge.

#### Kontrollbestimmung IV.

In 100 cem desselben Hundeharns 32,5 mg Indican gelöst, mit 10 cem Bleiessig gefällt.

15 cem Filtrat verbrauchen in beiden Bestimmungen 11,4 cem Chamäleonlösung.

100 cem Filtrat verbrauchen 76 cem Chamäleonlösung.

Indicanzusatz in 100 cem Filtrat entspricht 74,6 cem.

Indicanzusatz in 100 cem Harn entspricht 82,06 cem, d. h. 14,51 mg Indigo.

Ber. 16,96 mg. gef. 14,51 mg. d. h. 85,63 % der zugesetzten Menge.

Vergleicht man die in den Harnanalysen gefundenen Indigowerte: 88, 84, 90 und 86 %, im Mittel also 87 %, mit den bei der Analyse reiner Indicanlösungen gefundenen: 84, 87, 84, im Mittel 85 %, so ist die Übereinstimmung eine durchaus befriedigende. Man darf daraus schließen, daß die im Harn enthaltenen Substanzen unter den eingehaltenen Bedingungen die Indicanbestimmung nicht stören, und weiter, daß der Fehler, welcher der Methode prinzipiell anhaftet, innerhalb ziemlich weiter Grenzen konstant bleibt. Handelt es sich um die Ermittlung der absoluten Indigowerte, so muß zu der gefundenen Menge  $\frac{1}{6}$  des Wertes hinzugefügt werden.

Die Ausführung der Bestimmung im Menschen- oder Hundeharn sei hier noch einmal zusammengefaßt.

Der sauer reagierende oder mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn wird mit  $\frac{1}{10}$  Volumen Liquor plumbi subacetici gefällt; falls das spezifische Gewicht sehr hoch ist (etwa über 1040), wird der Harn vorher auf die Hälfte verdünnt.

Je nach dem Gehalt an Indican, über welchen man sich durch eine qualitative Vorprobe ein Urteil zu bilden sucht, variierend, wird ein abgemessenes Volumen des Filtrats vom Blei-nieterschlag mit dem gleichen Volumen Obermayers Reagens im Schütteltrichter<sup>1)</sup> versetzt und sofort mit Chloroform mehr-

<sup>1)</sup> Der Trichter soll einen gut schließenden Hahn besitzen, der nicht stark eingefettet werden muß, weil sonst Fett von dem Chloroform aufgenommen wird.

mals ausgeschüttelt, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt. Das Volumen des Filtrats soll so gewählt werden, daß 3—4 Ausschüttelungen mit je etwa 30 ccm Chloroform und jedesmal ein etwa 2 Minuten langes Schütteln genügen. Das Reagens muß durch Auflösen von festem Eisenchlorid in reiner konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 hergestellt werden. Bei Anwendung roher Salzsäure erhält man zu hohe Indigowerte. 2 g Eisenchlorid im Liter genügen, Lösungen von 1 g oder 4 g im Liter änderten nichts am Resultate.

Die abgelassenen Chloroformlösungen bleiben einige Minuten im Kölbchen stehen und werden durch ein trockenes Filter in einen trockenen, sorgfältig gereinigten Kolben filtriert. Das Chloroform wird auf dem Wasserbade abdestilliert, der Rückstand auf dem Wasserbade im liegenden offenen Kolben noch etwa 5 Minuten lang getrocknet.

Der trockene Rückstand wird mit heißem Wasser zweibis dreimal ausgewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr gefärbt erscheint. Eine Loslösung von Indigopartikelchen vom Glase wurde dabei nur sehr selten beobachtet. Wenn dieser Fall eintritt, muß das Waschwasser durch ein kleines Filterchen filtriert und der Filtrerrückstand nach dem Trocknen mit Chloroform extrahiert werden. Der Rückstand einer solchen zweiten Chloroformlösung wird dann ohne nochmaliges Auswaschen in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mit der Hauptmenge vereinigt.

Der mit heißem Wasser ausgewaschene Indigo wird nach Abgießen des Wassers mit etwa 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure, die Kaliumpermanganat nicht entfärben darf, aufgenommen und zur vollständigen Lösung 5—10 Minuten lang auf dem kochenden Wasserbad erwärmt. Die Schwefelsäurelösung wird in einen sorgfältig gereinigten Erlenmeyer-Kolben gegossen, in welchem sich etwa 100 ccm destilliertes Wasser befinden, und mit destilliertem Wasser in den Kolben nachgespült. Die blaue Lösung war fast stets vollständig klar, geringe Trübung erschwert das Erkennen des Endpunktes der Titration, macht die Bestimmung aber nicht unmöglich.



Zur heißen Lösung wird Kaliumpermanganatlösung in der von Wang angegebenen Verdünnung (5 ccm Stammlösung von etwa 3 g in 1 Liter auf 200 verdünnt) so lange zugegeben, bis der rötliche Ton in reines Gelb umgeschlagen ist. Der Titer der Chamäleonlösung muß mit reinem Indigoblau gestellt werden. Die Umrechnung des Wertes aus einer Titration mit Normaloxalsäure, welche Wang empfiehlt, genügt nicht, wie schon Mohr,<sup>1)</sup> der diese Bestimmung des Indigos in die analytische Praxis eingeführt hat, betonte.

So modifiziert, genügt die Methode auch in Bezug auf Schnelligkeit und Bequemlichkeit der Ausführung den Ansprüchen, welche man an eine für klinische Zwecke brauchbare Methode stellen muß. Bei einiger Übung läßt sich in 1½ Stunden eine Doppelbestimmung vollständig durchführen.

Von den kolorimetrischen Methoden, welche für ungefähre Schätzungen des Indicangehalts am Krankenbette angegeben sind, wurden die von Bouma, vereinzelt auch die Strausssche mit der Titriermethode in ihren Resultaten verglichen.

Nach der Vorschrift von Strauss schüttelt man in einem graduierten Schütteltrichter ein abgemessenes Volumen des vom Bleiniederschlag abfiltrierten Harns mit dem gleichen Volumen Obermayers Reagens und gemessenen Chloroformmengen aus. Die Chloroformlösung wird dann mit ebenfalls gemessenen Portionen Chloroform so weit verdünnt, bis der Farbenton gleich dem einer Standardlösung von reinem Indigoblau in Chloroform ist. Unzweckmäßig scheint mir dabei, als Standardlösung eine so schwach gefärbte Flüssigkeit zu nehmen. Wenn auch der Apparat dadurch ein wenig komplizierter wird, sollte man doch lieber eine Anzahl Standardröhrchen mit verschiedenen konzentrierten Lösungen wie im Boumaschen Apparat benutzen, denn das Einrangieren einer Chloroformprobe zwischen zwei Standardlösungen ist leichter als der Vergleich mit einer einzigen, sehr verdünnten.

Mit frisch hergestellten Vergleichslösungen ließen sich

---

1) Lehrbuch der chem.-analyt. Titriermethode, Braunschweig 1886.

immerhin leidlich stimmende Resultate gewinnen. Ob die Lösungen ihre Farbe unverändert selbst im Dunkeln und in zugeschmolzenen Röhren bewahren, scheint mir zweifelhaft. In dem benutzten Apparat hatten bereits nach einigen Tagen die beiden Proberöhrchen, welche gleich konzentrierte Lösungen enthalten sollten, einen deutlich verschiedenen Farbenton. Dadurch kommt natürlich eine Unsicherheit in die Methode, die erst gehoben werden könnte, wenn ausreichende Erfahrungen über die Haltbarkeit von Indigolösungen in Chloroform gesammelt sind.

Bouma benutzt, wie schon kurz erwähnt, zur Überführung des Indicans in Indigo eine Auflösung von 2 cg Isatin in 1 Liter konzentrierter Salzsäure, von der Voraussetzung ausgehend, daß beim Erhitzen mit dieser Lösung Indoxyl quantitativ in Indigorot übergeführt wird. Das gebildete Indigorot wird mit Chloroform ausgeschüttelt und entweder mit Standardlösungen verschiedenen Gehalts in einem praktisch zusammengestellten Apparat verglichen oder, nach verschiedenen Reinigungsprozeduren in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, mit Chamäleonlösung titriert.

Die titrimetrische Methode habe ich einer Kontrolle mit reinen Indicanlösungen nicht unterzogen, weil bei den im Harn ausgeführten Bestimmungen nur selten klare Lösungen in Schwefelsäure erzielt werden konnten und beim Filtrieren nach der Vorschrift von Bouma durch Zurückbleiben gelösten Farbstoffs auf dem Filter ganz unsichere Werte erhalten wurden. Überdies ist die Methode erheblich umständlicher und zeitraubender als die oben beschriebene.

Bei den kolorimetrischen Bestimmungen hat Bouma selbst die Beobachtung gemacht, daß der Farbenton der Chloroformlösung öfters kein rein roter war, und er hat in einer späteren Mitteilung<sup>1)</sup> Mittel angegeben, um die gleichzeitige Bildung von Indigoblau zu verhüten. Da ich mich aber überzeugt habe, daß selbst reine Indicanlösungen mit Isatinsalzsäure blauviolette Lösungen gaben, daß also die Reaktion nicht so glatt verläuft,

1) Deutsch. med. Wochenschr., 1902, Nr. 39.

wie Bouma annahm, scheint mir diese Methode von Zufälligkeiten abhängig und deshalb vorläufig nicht empfehlenswert.

Wenn man gerade den richtigen mit den Standardlösungen vergleichbaren Farbenton getroffen hat, so stimmen die Werte mit den nach obiger Methode erhaltenen annähernd überein, wie folgende Vergleichstabelle zeigt. Es wurden gefunden in 1000 cem Harn:

titrimetrisch:	kolorimetrisch:
I. 14 m.	10—15 mg
II. 11	10—15
III. 32	30
IV. 5	unter 5

Prinzipiell dürfte nur dann einer kolorimetrischen oder besser spektro-photometrischen Methode vor der titrimetrischen ein Vorzug einzuräumen sein, wenn in einem Harn beim Gebrauch von Arzneimitteln körperfremde Stoffe ausgeschieden werden, welche in den Chloroformauszug übergehen und mit heißem Wasser aus dem Rückstand nicht entfernt werden können.

## Chlorophyll, Hämoglobin und Lipochrome.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

**L. Marchlewski.**

(Der Redaktion zugegangen am 19. April 1903.)

Bekanntlich zeigte v. Pechmann,<sup>1)</sup> daß Maleinsäureanhydrid, wie auch andere Anhydride maleinoider Säuren, sich mit Kohlenwasserstoffen bei Anwesenheit von Aluminiumchlorid kondensieren, dabei Ketonsäuren liefernd, die unter dem Einfluß von wasserentziehenden Mitteln in Farbstoffe übergehen. Letztere dürften, wie ich zeigen möchte, ein gewisses Interesse beanspruchen. Die erwähnten Farbstoffe zeigen mit den Lipochromen große Ähnlichkeit. Sie lösen sich in konzentrierter Schwefelsäure

<sup>1)</sup> Berl. Ber., Bd. 15, S. 885, 891.