

Über Harnindican.

Von

Ch. Porcher und **Ch. Hervieux.**

(Laboratorium der Chemie der École vétérinaire zu Lyon.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juni 1903.)

Die Frage über das Indican des Harnes ist schon Gegenstand vieler Arbeiten gewesen, in denen man zahlreichen Widersprüchen begegnet, besonders betreffs der Beziehungen, die zwischen dem Indigoblau und Indigorot bestehen.

Man hatte schon beobachtet, daß sich niemals allein Indigoblau bei der Oxydation des Indoxyls, das durch Zersetzung des Indicans des Harnes freigemacht war, bildete und daß man außer dieser blauen auch rote und ferner braune Substanzen erhielt.

Wang¹⁾ nahm an, daß diese letzteren Verunreinigungen seien, von denen man das Indigoblau durch Waschen mit Alkohol und Äther befreien müßte. Bouma²⁾ dagegen behauptete, daß diese sogenannten Verunreinigungen nicht vom Indigoblau getrennt werden dürften, denn sie gehörten mit ihm zusammen in dieselbe Gruppe. Unter diesen Umständen ist es verständlich, daß eine kolorimetrische Bestimmung des Indigoblau exakte Resultate nicht ergeben konnte, wenn man die rote und braune Substanz, die Wang als Verunreinigungen zurückwies, mit darunter verstehen mußte.

Es handelte sich also darum, die Diskussion über die Frage nach der Einheitlichkeit des Ursprunges der blauen und roten Substanz im Harn zur Entscheidung zu bringen. Diese Einheitlichkeit war von Bouma in einer ersten Arbeit an-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 137. 1899.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 348. 1899.

genommen, aber von ihm selber in einer zweiten geleugnet.¹⁾ Die Untersuchungen über diese Frage wurden stetig fortgesetzt, und zwar hauptsächlich auf Grund folgender zwei Beobachtungen. Erstens: Alle Methoden der Extraktion des Indigoblau im Harn führten zur Bildung von Indigorot. Zweitens: Aus derselben Menge Flüssigkeit entstehen verschiedene Mengen Blau und folglich auch Rot, je nach der angewandten Methode. Hiernach ist es wahrscheinlich, daß das eine sich in das andere umwandelte.

Bezüglich des letzten Punktes ist ein wirklich entscheidender Beweis nur durch die sehr interessanten Arbeiten Maillards erbracht worden, der zeigte, daß man das Blau allmählich durch das Rot ersetzen könne, je nach der Versuchsanordnung.²⁾

In der vorliegenden Arbeit werden wir über die Beobachtungen berichten, die wir an Pferde- und Hundeharnen machten, Beobachtungen, die das bestätigen, was Maillard schon früher als bestimmend für die Umwandlung des Indigoblau in Indigorot angab.

Zunächst wollen wir den Einfluß der verschiedenen Reinigungsmethoden auf das Indican des Harnes einer Prüfung unterziehen.

Wir arbeiteten vorzüglich mit Pferdeharn, teils weil wir ihn uns leicht in großen Mengen verschaffen konnten, teils weil dieser Harn sehr reich an Indican ist; aber wir dehnten unsere Untersuchungen auch auf Hunde- und Menschenharn (Studenten des Institutes) aus.

I. Reinigung mit basischem Bleiacetat.

Während dieses Salz in Form von Bleiessig, also bei Untersuchungen über die Zuckerarten des Harnes nicht verwandt werden darf, liegen bei der uns beschäftigenden Frage die Verhältnisse anders. Die Reinigung selbst mit einer 20⁰/oigen Bleiessiglösung (das ist zuweilen bei sehr konzentrierten Pferdeharnen nötig) reißt das indoxyl-schwefelsaure Kalium nicht in höherem Maße mit nieder als das Phenylsulfat. Hiervon konnten wir uns direkt überzeugen, indem wir den Indigo in dem durch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 117. 1901.

²⁾ Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, t. 132, p. 990.

die Reinigung erzeugten Niederschlage suchten. Dieser letztere mußte zu dem Zwecke vorher gewaschen werden, dann wurde er in destilliertem Wasser zu einer Emulsion aufgeschwemmt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Flüssigkeit wurde filtriert, auf dem Sandbade eingengt, aber es war nicht möglich, darin Indigo zu finden.

Da das basische Bleiacetat die zusammengesetzten Glykuronsäuren, die dem Harn seine linksdrehenden Eigenschaften verleihen,¹⁾ niederschlägt, so können wir hieraus zugleich den Schluß ziehen, daß die indigobildende Substanz, wenigstens beim Pferde, nicht als Indoxylglykuronsäure im Harn vorhanden ist.

Da das basische Bleiacetat das Indican also nicht mit sich reißt,²⁾ so hat man in diesem Reagens ein energisches Reinigungsmittel; es besitzt dem neutralen Bleiacetat gegenüber den Vorteil, den Harn sehr kräftig zu entfärben, und das gibt die Möglichkeit, die Farbe der über dem Chloroform schwimmenden Flüssigkeit unschwer zu beurteilen, wenn man das entstandene Indigoblau extrahiert. Wenn man übrigens den Harn, der mit Salzsäure und einem Oxydationsmittel versetzt ist, mit Chloroform schüttelt, um das entstandene Indigoblau allmählich aufzunehmen, so sammelt sich das Chloroform sehr schnell am Boden, ohne jene trübe Beschaffenheit anzunehmen, die in der Regel ohne diese Reinigung eintritt.

II. Reinigung durch Phosphorwolframsäure.

Wenn man den Harn durch Phosphorwolframsäure reinigt, so hat die große Menge Salzsäure, die bei diesem Verfahren angewandt wird, unter anderem den Erfolg, das Indoxyl nach und nach frei zu machen; indem dieses sich dann allmählig unter dem Einflusse des Sauerstoffes der Luft oxydiert, bildet es Indigoblau. Die Folge davon ist, daß der Niederschlag,

1) Ch. Porcher, Études sur l'urine du cheval. Journ. d. méd. vét. 31. Aug. 1902.

2) «Man kann sich leicht von der Richtigkeit dieser Tatsache überzeugen; trotzdem findet man merkwürdigerweise die Angabe, daß das Indican durch Bleiacetat niedergeschlagen werde.» Bertault, Journal de Pharmacie et Chimie (VI). 15, p. 278. Dieser Autor hat sicherlich falsch beobachtet.

der anfangs eine gelblich-graue Farbe hatte, allmählich eine schmutzig violette Farbe annimmt, während die obenauf schwimmende Flüssigkeit selber von bräunlich-blauer Farbe ist. Die nach 12—14 Stunden ausgeführte Filtration ergibt ein zwar klares, aber wie beschrieben bräunlich-blaues Filtrat. Schüttelt man mit Chloroform aus, so nimmt es eine ganz schwach blaue Farbe an; folglich war das Indigotin fast vollständig mit dem Niederschlage fortgerissen. Behandelt man die Flüssigkeit einige Minuten mit Tierkohle, so verliert sie ihre bräunlich-blaue Farbe und liefert ein von Indigo freies Filtrat.

III. Reinigung mit Quecksilbernitrat.

(Verfahren von Patein und Dufau.)

Die Flüssigkeit, die man von nach diesem Verfahren gereinigtem Harn bekommt, enthält keine Spuren von Indigo mehr.

IV. Reinigung mit Quecksilberchlorid.

Setzt man zu dem Urin Quecksilberchlorid ($\frac{19}{20}$ seines Volumens einer gesättigten Lösung zu $\frac{1}{20}$ einer gleichfalls gesättigten Natriumacetatlösung), so liefert er einen reichlichen Niederschlag, in dem der größte Teil des Indicans mit fortgerissen ist. Das 5 Minuten lang zum Sieden erhitzte, mit Ammoniak, zum Beseitigen des Quecksilberüberschusses, versetzte Filtrat liefert dann nur noch Spuren von Indigo; zuweilen ist es ganz unmöglich, ihn überhaupt nachzuweisen.

Nach den soeben angestellten Betrachtungen über den Einfluß der gewöhnlich bei der Harnuntersuchung auf Indican angewandten Reinigungsmittel kommen wir zu dem Schlusse, daß das basische Bleiacetat für diesen Zweck das einzig Brauchbare ist.

Um Indigoblau nachzuweisen, ist bekanntlich folgendes nötig: 1. eine Säure, um das Indican zu spalten, 2. ein auf das freigemachte Indoxyl einwirkendes Oxydationsmittel.

Die angewandte Säure war stets Salzsäure; nur einigemal wurde Schwefelsäure benutzt, die aber den Nachteil hat, daß sie viel stärker als die Salzsäure wirkt und daß sie in ein- und demselben Harn mehr Indigorot liefert, als die Salzsäure. Der Urin muß mit dem gleichen Volumen Salzsäure versetzt werden. Bei geringerer Menge dieser Säure wird die Spaltung

des Indicans verzögert, was, wie wir weiter unten sehen werden, nicht günstig ist, da es zur Bildung eines zu großen Bruchteiles von Indigorot führt.

Wenn man die Spaltung des Indicans auf dem Sandbade vollzieht, so sollte man von vornherein erwarten, daß man geringerer Mengen Säure benötige. Das ist auch der Fall, aber man erhält dann bei diesem Verfahren stets nur Indigorot. Wir haben häufig das Verfahren angewandt, das Bouma¹⁾ zur quantitativen Bestimmung des Indigo empfohlen hat: nämlich das Erhitzen des zuvor gereinigten Harnes mit basischem Bleiacetat während einiger Minuten auf dem Sandbade unter Zusatz einer Lösung salzsauren Isatins; jedesmal hatte das Chloroform eine rote Farbe angenommen, denn unter diesen Bedingungen bildet sich nur Indirubin. Gleichwohl hatten dieselben Harn, mit denen wir nach der unten angegebenen Methode verfahren, in Chloroform eine sehr schöne blaue Lösung gegeben. — Es sei nochmals darauf aufmerksam gemacht, daß Bouma recht hatte, daß Indigoblau nicht vom -Rot und -Braun zu trennen, da derselbe Harn, je nach der Behandlungsweise, verschiedene Farben in Chloroform gibt.

Das von uns angewandte Oxydationsmittel war das käufliche Wasserstoffsperoxyd von 10—12 vol. Es ist zwar sicher, daß die meisten der bisher untersuchten Oxydationsmittel einander gleichwertig sind und daß sie dieselben Resultate geben, wenn man nur auf sie eingearbeitet ist, aber das Wasserstoffsperoxyd hat den Vorteil, ein nicht zu energisches und sehr handliches Mittel zu sein. Wir bedienen uns seiner schon seit langer Zeit im Laboratorium. Gewöhnlich nehmen wir 1 Tropfen Wasserstoffsperoxyd auf einen Cubikcentimeter gereinigten, zur Untersuchung kommenden Harnes. Wir vermeiden die unterchlorigsauren Verbindungen, denn während ein geringer Überschuß von Wasserstoffsperoxyd belanglos ist, so ist das bei den unterchlorigsauren Verbindungen nicht der Fall, da ihre oxydierende Wirkung zu stark ist, namentlich, wenn diese Verbindungen frisch bereitet sind.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82. 1901.

Wir konnten also dasselbe beobachten wie Maillard, daß nämlich „das freigemachte Indoxyl keineswegs immer dasselbe Endprodukt liefert und daß das Ende der Reaktion schwankt, je nach den Bedingungen, unter denen sich die Oxydation, die das Indoxyl in die Indigofarben umwandelt, vollzieht“. ¹⁾

Im Folgenden geben wir das Verfahren an, dessen wir uns bedienen, um diese Tatsache zu demonstrieren. Ein an Indican besonders reicher, normaler Pferdeharn wurde zur Reinigung mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens Bleiessig versetzt und der Überschuß des Bleies teils mit Schwefelwasserstoff, teils mit Natriumsulfat entfernt. ²⁾

In eine Anzahl Reagensgläser gießt man je 5 ccm gereinigten Harnes und 5 ccm Salzsäure; man läßt nun die Säure verschieden lange auf den Harn einwirken und zwar in dem ersten Glase (a) 1 Minute; in dem zweiten (b) 2 Minuten; in dem dritten (c) 5 Minuten; in dem vierten (d) 15 Minuten; im fünften (e) 30 Minuten; im sechsten (f) 60 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeiten fügt man zu jedem Röhrchen 5 Tropfen Wasserstoffsperoxyd, schüttelt kräftig 5 Minuten lang und gießt dann 5 ccm Chloroform nach, um in ihm den gebildeten Indigo zu sammeln.

Wir bekamen folgende Resultate:

a und b (Einwirkungsdauer von Harn und Säure 1 resp. 2 Minuten). Der Erfolg ist in beiden Fällen der gleiche; das Chloroform nimmt eine schöne blaue Farbe an, die Rotfärbung der daraufschwimmenden Flüssigkeit ist nur schwach.

c (5 Minuten). Die Farbe des Chloroforms nähert sich schon etwas dem Violett, sie ist blau-violett; die über ihm befindliche Flüssigkeit ist röter als bei a und b.

d (15 Minuten). Das Chloroform hat eine schön violette Farbe.

e und f (30 und 60 Minuten). In diesen beiden Röhren ist die Farbe des Chloroforms rot-violett, während die auf ihm schwimmende Flüssigkeit sehr schön rot ist.

¹⁾ Bulletin de la Soc. chimique (3) 29, p. 237.

²⁾ Es ist gleichgültig, ob man das überschüssige Blei durch Schwefelwasserstoff oder durch ein Carbonat oder durch Alkalisulfat entfernt.

Aus dieser ersten Versuchsreihe zogen wir den Schluß, daß eine Einwirkungsdauer der Salzsäure von höchstens 2 Minuten genüge, daß dann das Wasserstoffsperoxyd hinzugefügt werden müsse und daß 5 Minuten später die Aufnahme in Chloroform zu erfolgen habe.

Späterhin aber haben wir diese Methode geändert, da die Erfahrung uns lehrte, daß die Reaktionen, die die Bildung von Indigoblau bezwecken: Spaltung des Indicans und weitere Oxydation des Indoxyls, sehr heftig verlaufen. Wir verfahren jetzt in folgender Weise:

In einem Scheidetrichter mischen wir zu gleicher Zeit gereinigten Harn, Salzsäure, Wasserstoffsperoxyd, Chloroform in den oben angegebenen Verhältnissen (1 ccm Harn, 1 ccm Salzsäure, 1 ccm Chloroform, 1 Tropfen Wasserstoffsperoxyd von 10—12%). Dann wird das Ganze kräftig geschüttelt. Unter diesen Umständen geht der Indigo in demselben Maße, wie er sich gebildet hat, in das Chloroform über und entgeht so dem Einfluß der Salzsäure und des Wasserstoffsperoxyds. Das Chloroform nimmt dementsprechend eine schöne blaue Farbe an, und die über ihm geschichtete Harnflüssigkeit ist entfärbt oder besitzt höchstens noch eine ganz geringe Rotfärbung, wenn man sie in dicker Schicht betrachtet.

Wir nehmen an, daß, wenn man auf diese Weise vorgeht, das gesamte Harnindoxyl in Indigoblau, Indigotin umgewandelt wird, und daß sich nur zu vernachlässigende Spuren von Indigorot und -braun bilden konnten, da wir ja die hauptsächlichste Bedingung, unter der sich Indigorot bildet — d. h. die längere Einwirkungsdauer der Säure auf das Indigoblau des Harnes — umgangen haben. Um dessen Beständigkeit ganz zu sichern, braucht man ihn nur schnell von der Gegenwart der geringen, in dem Chloroform gelösten Menge Salzsäure zu befreien. — Wir konnten in der Tat dasselbe konstatieren, woraufhin schon Maillard die Aufmerksamkeit gelenkt hat, daß man nämlich «bei einem Überschuß von Chloroform bei Gegenwart der geringen Menge Säure, die es aus dem angesäuerten Harne aufnahm, innerhalb von 2 oder 3 Tagen, zuweilen sogar innerhalb einiger Stunden den Übergang von

Violett in Purpurrot und Dunkelrot beobachten kann.¹⁾ Wir waschen daher, sobald alles Indigoblau aufgelöst ist, die Lösung in Chloroform mehrmals mit destilliertem Wasser und schließlich nach dem Vorschlage Maillards mit einer ganz schwachen Sodalösung; das Chloroform bewahrt dann unveränderlich seine Anfangsfärbung.²⁾

Nach diesen Ergebnissen können wir uns der Schlußfolgerung Maillards anschließen, daß „die schnelle Oxydation des Indoxyls Indigoblau, die langsame -rot liefert. Wir fügen nur noch hinzu, daß der einheitliche Ursprung des Indigoblau und -rot aus dem Indoxyl sowohl durch die oben angeführten Tatsachen, auch als durch die Experimente Maillards nachgewiesen ist. Bei der Prüfung des Harns auf Indican muß man darauf bedacht sein, nur Indigoblau zu bekommen; hierzu werden die von uns angegebenen Vorschriften genügen.

Gemäß den von uns gemachten Beobachtungen dürfen wir mit Neubauer und Vogel, Maillard die Existenz von rotem Pigment im Harne, das auf Skatol zu beziehen wäre, bezweifeln.

Der einzige Beweis, den man für die Existenz solcher Pigmente anführen könnte, stützt sich auf ihre Farbe; aber diese sind nach unseren Untersuchungen ebensogut auf die Bildung von Indigorot zu beziehen.

Im Anschluß an unsere auf die Technik bezügliche Ausführung sei uns noch eine Bemerkung physiologischen Inhalts gestattet: Bei allen normalen Harnen vom Pferde, Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen und auch vom Menschen, die wir in den Bereich unserer Untersuchungen zogen, fiel die Prüfung auf Indigo positiv aus. Nach unserer Ansicht ist das Indican ein ganz normaler Bestandteil des Harns und folglich verliert die Wichtigkeit, die man bisher der Indicanurine in diagnostischer Hinsicht beimaß, beträchtlich an Bedeutung.

¹⁾ Bulletin de la Société chimique (3) XXIX, p. 136.

²⁾ Wir glauben jedoch, daß das Oxydationsmittel, welches das Chloroform aus dem angesäuerten Harne aufnahm, beiträgt, das Indigoblau in Indigorot umzuwandeln.
