

Nachtrag zur Methodik der Indicanbestimmung im Harn.

Von

Jac. Bouma in Utrecht.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Straßburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. August 1903.)

Nachdem voriges Jahr von französischer Seite durch Maillard in der Académie des Sciences in Paris¹⁾ betont worden ist, daß meine Auffassung als richtig zu betrachten ist, wonach die roten Farbstoffe, die bei der Oxydation des Harnindoxyls neben dem Indigoblau entstehen, der Indigogruppe angehören und daher bei der Titration mit in Betracht kommen müssen, sind neulich auch von deutscher Seite durch Ellinger²⁾ diese Tatsachen weiter bestätigt worden.

In seiner Abhandlung zur Methodik der Indicanbestimmung im Harn hat er, außer in diesem Kardinalpunkt, noch in anderer Richtung meine Vorschläge befolgt, indem er den Bleiessig dem Bleizucker vorgezogen³⁾ und die Chamäleonlösung, statt auf Oxalsäure, auf Indigorein der Bad. Anilin- und Sodafabrik gestellt hat.⁴⁾ Mit der Anwendung dieser drei Abänderungen in der Indicanurometrie, hat dieser Forscher wesentlich die Wang-Obermayersche titrimetrische Harnindicanbestimmung nach meinen Vorschlägen modifiziert.

Daß diese Abänderungen schon Anklang gefunden haben, ergibt sich zu meiner Freude aus der Tatsache, daß auch Scholz im Jafféschen Institut bei seinen Untersuchungen

¹⁾ Compt. rendus, 132, S. 990—992.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 187.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 118.

⁴⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 89 u. 90.

über die Bildung des Indicans¹⁾ diese modifizierte Methode befolgt hat.

Die Frage, wann soll man die Harnfiltratferrichloridsalzsäuremischung mit Chloroform ausschütteln, scheint indessen noch immer ein Streitpunkt zu sein, indem Ellinger sich Wang anschließt und nur sofort dreimal zwei Minuten lang ausschüttelt, während er behauptet, daß man Verlust an Indigo hat, wenn die Mischung längere Zeit stehen bleibt.

In einer früheren Mitteilung²⁾ habe ich betont, daß man mit der letzten Extraktion wenigstens eine halbe Stunde warten soll, bevor dieselbe vorgenommen wird. Die dabei erwähnten Zahlen beziehen sich ausschließlich auf das, nach Waschen der Chloroformrückstände mit Ätheralkoholwasser, erhaltene reine Indigoblau und zeigen, daß die Oxydation bei Zimmertemperatur erst nach längerer Zeit vollkommen ist, während man durch die verzögerte Ausschüttelung keinen Verlust an Indigo zu bedauern hat.

Ich muß Ellinger beistimmen, daß die Darstellung des Reagens aus festem Eisenchlorid und Salzsäure von 1,19 spezifischem Gewicht bei der Indigoblaufestimmung von großem Einfluß ist, da die Reaktion mit Salzsäure von geringeren Stärkegraden viel langsamer verläuft. Öfters färbt sich indicanhaltiges Harnfiltrat nach dem Vermischen mit dem nach obiger Vorschrift bereiteten Reagens sofort schwärzlich und läßt sich das Indigo vollständig sofort in drei Malen ausschütteln. Das ist jedoch, auch nach Anwendung der stärksten Salzsäure, durchaus nicht immer der Fall.

Nachdem ich längere Zeit nach der Ursache dieser Tatsache gesucht hatte, zeigte es sich, daß die Bleifällung nicht ohne Einfluß auf diesen Vorgang ist.

Ich habe z. Z. die Fällung mit $\frac{1}{10}$ Volumen Bleiessig aus empirischen Gründen als praktisch verwertbar angenommen und empfohlen; d. h. ich habe angegeben, daß man nach dem Gebrauch dieser Menge von Bleisalz die störenden Substanzen

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 525.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 123.

fällt, während im allgemeinen beim Eingießen des Salzsäure-reagens keine Fällung von Bleichlorid stattfindet.

Es bleibt jedoch immerhin eine Tatsache, daß, auch ohne daß Bleichlorid ausfällt, der Löslichkeit dieses Salzes in Salzsäure entsprechend, sehr verschiedene Mengen der Salzsäure vom Überschuß an basischem Bleisalz gebunden werden können, was einfach vom Gehalt des Harns an bleibenden Substanzen abhängt.

So sieht man bisweilen die Reaktion prompt und bisweilen langsamer verlaufen. Daß ein geringer Unterschied in der Stärke der Salzsäure von großem Einfluß auf den Verlauf der Reaktion ist, ergibt sich schon daraus, daß ich mit einer Salzsäure von 1,19 spezifischem Gewicht eine prompte Reaktion erhielt, während diese bei demselben Harnfiltrat mit einer Salzsäure von 1,16 spezifischem Gewicht langsam verlief.

Mir scheint, daß die vielumstrittene Frage der Ausschüttelung vom genannten Standpunkt aus ganz gut zu erklären ist, und ich muß im Interesse der Genauigkeit dieser Methode meinen alten Vorschlag aufrecht erhalten, daß man nach einer halben Stunde eine nochmalige Ausschüttelung mit Chloroform vornehmen soll.

Es kann hierbei gar keine Rede sein von Verlust an Indigo; im Gegenteil, alles, was man noch herausschüttelt, ist reiner Gewinn.

Außerdem sind die diesbezüglichen Versuche IV, V und VI von Ellinger¹⁾ nicht zweckmäßig angestellt.

Probe IV wird gekocht, Probe V wird auf dem Wasserbade eine halbe Stunde lang erhitzt und danach 16 Stunden stehen gelassen, während Probe VI zweimal 24 Stunden stehen gelassen wird. Diese drei Fälle können sich nicht auf die Frage der Indicanbestimmung beziehen.

Daß Ellinger bei diesen Versuchen große Verluste hatte, glaube ich gern; ich habe dasselbe schon früher betont für das Erhitzen mit Obermeyers Reagens²⁾ und will auch bei

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 185.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 354.

protrahierten Dauerproben bei Zimmertemperatur die Isatinbildung durchaus nicht verneinen, aber wir lassen bei der Indicanbestimmung die Mischung nicht zweimal 24 Stunden stehen und ebensowenig wird dieselbe erhitzt.

Noch muß ich hierbei bemerken, daß die Annahme einer schnellen Überoxydation des Indigos durch Ferrichlorid sich schwer reimen läßt mit den folgenden Bemerkungen Ellinger¹⁾ (mit denen ich übrigens ganz einverstanden bin): «Die drei Bestimmungen zeigen, daß die Verdünnung der Indicanlösungen, bezw. der Überschuß an Obermayers Reagens ohne wesentlichen Einfluß auf das Resultat sind» und etwas weiter:²⁾ «2 g Eisenchlorid im Liter genügen, Lösungen von 1 g oder 4 g im Liter änderten nichts am Resultate». Diese größere Stärke der Ferrichloridlösung, d. h. der größere Überschuß müßte sich dann doch geltend machen auf die Überoxydation des Indigos zu Isatin, wodurch Ellinger zum Teil die Bildung des Indigorots neben dem Indigoblau bei der Indicanbestimmung zu erklären versucht. Das in Salzsäurelösung befindliche Indoxyl soll mit dem gebildeten Isatin das Indigorot entstehen lassen.

Obgleich ein derartiges Vorgehen bei der Annahme einer schnellen Überoxydation auf der Hand liegt, so lassen sich doch dagegen Bedenken erheben.

Wie schon oben erwähnt worden ist, hat die Stärke des Reagens keinen Einfluß auf die Ausbeute an Gesamt-Indigofarbstoffen. Welche der Indigomodifikationen in den Vordergrund tritt, tut nichts zur Sache, da das Endresultat unverändert bleibt.

Falls nun die obige Auffassung richtig ist, so muß das Mengenverhältnis der auftretenden Indigomodifikationen, bei übrigens ganz identischer Behandlung desselben Harnfiltrats, bei verschiedenen Stärkegraden des Reagens auch verschieden sein; beim Gebrauch des schwachen Reagens muß sich also mehr und beim Gebrauch des stärkeren weniger Blau, d. h. resp. weniger und mehr Rot bilden. Zur Prüfung dieser Voraus-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 184.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 193.

setzung habe ich von 2 gleichen Portionen desselben Harnfiltrats, die eine mit Reagens von 1 g pro Liter und die andere mit Reagens von 4 g pro Liter versetzt und beide sofort viermal 2 Minuten lang mit Chloroform ausgeschüttelt. Der dritte Auszug war nur schwach gefärbt, während der vierte ganz farblos war; ich ließ beide Portionen mit dem farblosen Chloroform absichtlich noch eine halbe Stunde stehen und komme hierauf unten noch weiter zurück.

Die zwei Chloroformauszüge wurden beide in gleiche Hälften geteilt, sodaß ich von jeder Harnportion die gesamte Indigoausbeute und (durch Waschung nach Wang) das reine Indigoblau bestimmen könnte.

Die Ergebnisse waren folgende:

Verarbeitet 880 ccm Filtrat = 800 ccm Harn.

Portion I (mit 1 g Fe_2Cl_6):

Hälfte **a** (Gesamt-Indigofarbstoff) 8,2 mg

» **b** (reines Indigoblau) 5,9 mg

Portion II (mit 4 g Fe_2Cl_6):

Hälfte **a** (Gesamt-Indigofarbstoff) 8,3 mg

» **b** (reines Indigoblau) 6,1 mg

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Stärke des Reagens nicht nur keinen Einfluß hat auf die totale Indigomenge, sondern ebensowenig auf das Mengenverhältnis der auftretenden Indigomodifikationen; die kleinen Unterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenzen.

Die beiden stehen gebliebenen Scheidetrichter wurden mit ihrem Inhalt (siehe oben) nach einer halben Stunde tüchtig geschüttelt; das früher farblos gebliebene Chloroform färbte sich jetzt deutlich blau. Die Titration ergab:

Portion I (Gesamt-Indigofarbstoff) 0,6 mg

» II (») 0,3 »

Total 0,9 mg

Portion I, Hälfte **a** ergab 8,2 g Gesamt-Indigofarbstoff

» II, » **a** » 8,3 » »

Total in der Hälfte des Filtrats 16,5 g »

Total im ganzen Filtrat $16,5 \times 2 = 33$ mg Indigo.

$33:0,9 = 100:2,7$.

Nachträglich wurden hier also noch 2,7% Indigo erhalten; in diesem Falle auch wiederum kein Verlust, sondern Gewinn.

Außerdem, falls eine so schnelle Überoxydation stattfindet, dann muß dies vorzugsweise der Fall sein beim Gebrauch der stärksten Oxydationsmittel, sowie die von Jaffé gebrauchte Chlorkalklösung; wir müßten also bei der Jafféschen Reaktion mehr Rotbildung wahrnehmen als beim Gebrauch von schwächeren Oxydationsmitteln. Die Tatsachen sind jedoch im Widerspruch mit dieser Voraussetzung; bei der Jafféschen Indicanprobe bekommt man gerade den schönsten blauen Chloroformauszug, während dieser beim Gebrauch von Ferrichlorid öfters mehr oder weniger violett ist.

Es bleibt nun übrig, festzustellen, ob das Waschwasser vom Chloroformrückstand bei der Indicanbestimmung mit Ferrichloridsalzsäure, sowie dieselbe praktisch ausgeführt wird, eine meßbare Quantität Isatin enthält oder nicht. Für jede Probe wurden 110 ccm Filtrat, entsprechend 100 ccm Harn, verarbeitet, welche nach der Vermischung mit Obermayers Reagens sofort dreimal ausgeschüttelt wurden; der Chloroformrückstand wurde mit heißem Wasser extrahiert, der Auszug durch ein trockenes Filter filtriert (siehe unten), das Wasser verdunstet und der gelbe Rückstand in 5 ccm rauchender Salzsäure aufgenommen. Diese Lösung wurde zuerst mit 5 ccm indicanhaltigem Harnfiltrat vermischt, bis zum Kochen erhitzt, dann abgekühlt und mit 2 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform färbte sich dabei rein gelb, ohne den geringsten Stich ins Rote zu zeigen. Zur Kontrolle wurden auch 5 ccm Salzsäure, welche $\frac{1}{10}$ mg Isatin enthielt, versetzt mit 5 ccm desselben Harnfiltrats und ferner auf analoge Weise behandelt. Der Chloroformauszug zeigte sich bei dieser Probe rein rot.

Es war also in diesem gelben Rückstand von 100 ccm Harn, welcher titrimetrisch 3,7 mg Indigo ergab, noch nicht einmal eine meßbare Menge Isatin.

Diese Probe mit dem gelben Rückstand von je 100 ccm Harn habe ich mit Indicanlösung, welche ich aus Harn nach

Stokvis¹⁾ bereitete, und mit Lösungen von reinem Indoxyl, welche die Bad. Anilin- u. Soda-Fabrik mir gütigst zur Verfügung stellte, wiederholt, jedesmal unter Kontrolle einer Probe mit 5 ccm $\frac{1}{10}$ mg Isatin enthaltender Salzsäure.

Alle Versuche ergaben dasselbe Resultat, nämlich, daß keine meßbare Quantität Isatin gebildet worden war, indem die Chloroformauszüge auch nicht den allergeringsten Stich ins Rote zeigten, während die Isatinproben alle positiv ausfielen. Nachdem also festgestellt worden war, daß Isatinbildung bei sofortiger Ausschüttelung keine Rolle spielt, müßte noch festgestellt werden, wie sich die Sache verhält beim nachträglichen Ausschütteln nach einer halben Stunde und beim Ausschütteln der ganzen Menge Indigo nach einer halben Stunde.

Ich verarbeitete hierzu dasselbe Harnfiltrat²⁾ in gleichen Mengen von 110 ccm, entsprechend 100 ccm Harn. Bei diesem Harn war der nachträgliche Chloroformauszug nur schwach blau gefärbt; die Menge an Gesamt-Indigofarbstoffen betrug 3,9 mg (gegen 3,7 mg bei den vorigen Proben). Das Waschwasser war gelb; der Rückstand, nach Verdunsten des Wassers in 5 ccm rauchender Salzsäure aufgenommen, hatte annähernd den gleichen Farbenton wie die zur Kontrolle benutzte Isatinsalzsäurelösung. Die Versuche mit den drei genannten Indoxylösungen wurden wiederholt und kontrolliert mit 5 ccm $\frac{1}{10}$ mg Isatin enthaltender Salzsäure. Auch jetzt war bei den Rückständen in keiner der drei Proben die allergeringste Spur von Rotfärbung wahrzunehmen; das Chloroform färbte sich rein gelb, während die Isatinsalzsäureproben alle ein tadellos rein rotes Chloroformextrakt lieferten.

Auch in diesen Fällen, d. h. nach einer protrahierten Oxydationsdauer von einer halben Stunde, befand sich also noch nicht eine nachweisbare Menge Isatin im Chloroform-

¹⁾ Nederl. Tydschr. v. Geneeskunde, 1901, Deel I, P. 961.

²⁾ Mit dem Ausdruck, «dasselbe Harnfiltrat» (siehe auch oben), meine ich ein Filtrat von demselben Harn, frisch gefällt mit Bleiessig; läßt man nämlich das Filtrat längere Zeit stehen, dann wird das Mengenverhältnis der Indigomodifikationen so beeinflusst, daß das Rot mehr in den Vordergrund tritt.

auszug, während nachträglich noch $3,9 - 3,7 = 0,2$ mg Indigo gewonnen wurden; diese Menge von Indigo war doch der Einwirkung des Reagens während einer halben Stunde ausgesetzt und würde bei Überoxydation über $0,2$ mg Isatin geliefert haben.

Zum Schluß wurde das Harnfiltrat mit dem Reagens vermischt und eine halbe Stunde stehen gelassen, sodaß die ganze Menge des gebildeten Indigos der Wirkung des Reagens während dieser Zeit ausgesetzt war. Das gelbe Waschwasser des Chloroformrückstandes wurde auf die genannten drei Weisen untersucht, jedesmal unter Kontrolle der Reaktion mit $\frac{1}{10}$ mg Isatin. Es stellte sich heraus, daß sich auch bei dieser Prozedur keine meßbare Menge Isatin (jedenfalls viel weniger als $\frac{1}{10}$ mg) gebildet hatte, indem alle drei Reaktionen negativ ausfielen. Der Indigoertrag war dem der vorigen Probe ganz gleich, sodaß kein Verlust stattgefunden hatte.

Wenn wir diese Tatsachen den Befunden anknüpfen, daß die Konzentration des Reagens ohne Einfluß ist auf das totale Quantum und auf das Mengenverhältnis der auftretenden Indigomodifikationen, dann glaube ich daraus schließen zu dürfen, daß die Indigorotbildung nicht einer schnellen Überoxydation zuzuschreiben ist und daß, wiewohl Überoxydation beim Erhitzen und beim längeren Stehen der Mischung stattfindet und wiewohl auch bei kurzer Prozedur spurenweises Auftreten von Isatin (Indopheninprobe) ab und zu in nicht meßbarer Menge sich nicht leugnen läßt, diese Tatsachen gar keine Rolle spielen bei der Indicanbestimmung.

Überall, wo Indigo aus seinen Mutterstoffen des Pflanzen- und des Tierreiches durch Spaltung und Oxydation gebildet wird, entsteht neben dem Indigoblau mehr oder weniger Indigorot. Ebensogut ist dasselbe umgekehrt bei Reduktionsvorgängen der Fall, u. a. beim Behandeln von Isatinchlorid mit Phosphortrichlorid und Phosphor (v. Baeyer-Emmerling) und beim Behandeln von Isatinchlorid mit Zinkstaub und Essigsäure (v. Baeyer). Selbst beim spontanen Verdunsten einer alkoholischen Lösung von reinem Indoxyl an der Luft entsteht neben dem Blau die rote Indigomodifikation; diese Bildung

kann keiner Überoxydation und nachheriger Bindung des Isatins mit Indoxyl zugeschrieben werden, und man muß wohl annehmen, daß beim Entstehen des Indigos diese Modifikationen immer nebeneinander aus ihren Muttersubstanzen gebildet werden.

So liegt die Sache auch beim Harnindican, jedoch geschieht die Bildung des Indigorots bei der Harnindicanbestimmung hauptsächlich beim Eindampfen des aus Harnfiltratreagensmischung erhaltenen Chloroformextrakts auf dem Wasserbade durch Umbildung von Blau in Rot, wie früher von mir betont¹⁾ und wie es auch von Ellinger bestätigt worden ist.²⁾

Diese Tatsache läßt sich durch das unten zu erwähnende Experiment mit absoluter Sicherheit beweisen. Ich wählte zu diesem Zweck Menschenharn, welcher ziemlich reich an Indican war, wobei der schwärzliche Farbenton nach Eingießen des Reagens sofort auftrat und das Chloroformextrakt keinen Stich ins Violette zeigte. Ich extrahierte die Mischung von 440 ccm, entsprechend 200 ccm Harn, dreimal mit 50 ccm Chloroform und ließ die Auszüge unmittelbar nach der Extraktion in einem Scheidetrichter, welcher zum Teil mit Aq. dest. gefüllt war, ablaufen. Die Berührung des Indigos mit dem Reagens war durch diese Behandlung aufs kürzeste beschränkt. Nach zweimaliger Ausschüttelung mit Wasser wurden die Indigolösungen in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade eingedampft. Der bekannte Umschlag der blauen Farbe ins Violette fand jetzt nicht statt.

Eine zweite gleiche Portion desselben Harns wurde auf ganz analoge Weise behandelt, jedoch ohne Waschen des Extrakts mit Wasser; die ursprünglich blaue Farbe schlug während des Verdunstens des Chloroforms ins Violette um. Der Rückstand der ersten Portion zeigte sich nahezu rein blau mit minimalem roten Belag, während der Rückstand der zweiten Portion mit einem ganz roten Belag überdeckt war. Nach dem Waschen beider Rückstände mit Ätheralkoholwasser titrierte

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 353—354.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 187.

ich das reine Indigoblau als Sulfosäure und fand bei der ersten 7,6 mg und bei der zweiten 5,8 mg Indigoblau. Es waren hier also während des Aktes des Abdampfens des Chloroforms $7,6 - 5,8 = 1,8$ mg Indigoblau in die rote Modifikation umgebildet.

Es bleibt nun noch ein Punkt übrig, worin Ellinger und ich prinzipiell verschiedener Ansicht sind.

Ich habe nämlich empfohlen,¹⁾ den Chloroformrückstand zu erhitzen zur Entfernung flüchtiger Bestandteile, welche ins Chloroform übergehen, während Ellinger²⁾ es als notwendig betrachtet, den Rückstand mit heißem Wasser auszuwaschen.

Daß diese, durch das Auswaschen mit heißem Wasser erhaltene, Flüssigkeit höchstens Spuren Isatin enthält, habe ich schon betont.

Ellinger³⁾ betont dagegen: «Unter den angewandten Versuchsbedingungen scheint aber überhaupt außer dem Isatin kaum eine andere Beimengung ins Chloroform überzugehen.»

Es bleibt also zur Entscheidung der Frage, ob man den Rückstand mit heißem Wasser extrahieren oder erhitzen soll zur Entfernung störender Bestandteile, noch zu untersuchen übrig, was die gelbe Flüssigkeit enthält. Nachdem oben schon betont worden ist, daß bei Portionen von 100 ccm Harn, welche 3,7 mg Indigo ergaben, mittels Indoxylösungen noch nicht $\frac{1}{10}$ mg Isatin nachweisbar war, muß ich an dieser Stelle zuerst auf die Indopheninprobe zurückkommen. In der ursprünglichen diesbezüglichen Arbeit⁴⁾ hat v. Baeyer diese Reaktion dem Benzol zugeschrieben, während später Viktor Meyer⁵⁾ festgestellt hat, daß sie dem das Benzol immer begleitenden Thiophen zuzuschreiben ist, was von v. Baeyer zugegeben wurde.⁶⁾

Über die Ausführung der Indopheninprobe findet man gewöhnlich angegeben, daß man die zu prüfende Substanz in Übermaß von konzentrierter Schwefelsäure lösen und danach

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 120.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 188.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 189.

⁴⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 12, S. 131.

⁵⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 16, S. 1465.

⁶⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 16, S. 1478.

mit thiophenhaltigem Benzol schütteln soll; letzteres soll sich bei Anwesenheit von Isatin blau färben.

So oft auf diese Weise die Probe mit reinem Isatin von Merck angestellt wurde, ebenso oft fiel diese negativ aus, selbst wenn noch Thiophen dem Benzol zugesetzt wurde.

Von v. Bayer¹⁾ war folgendes angegeben: «Bringt man Benzol, Xylol, Naphtalin usw. mit Isatin und konzentrierter Schwefelsäure zusammen, so tritt eine Kondensation ein.»

Übergießt man demnach eine Spur von Isatin zuerst mit thiophenhaltigem Benzol und setzt danach konzentrierte Schwefelsäure zu, dann tritt die blaue Reaktion sofort auf.

Es bewährt sich, die Indopheninprobe folgendermaßen auszuführen.

Man verdunstet die auf Isatin zu untersuchende Flüssigkeit in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade, übergießt den trockenen Rückstand mit etwas thiophenhaltigem Benzol und fügt danach konzentrierte Schwefelsäure hinzu; die Reaktion tritt bei Anwesenheit von Spuren Isatin sofort auf. Mit $\frac{1}{100}$ mg Isatin Merck erhält man auf diese Weise eine sehr deutliche blaue Reaktion und auch bei Anwesenheit von $\frac{1}{200}$ mg Isatin ist sie noch gut wahrnehmbar.

Nachdem also die ungefähre Empfindlichkeitsgrenze der Indopheninprobe festgestellt worden war, wurde der gelbe, wässrige Auszug von dem nach Erhitzen auf dem Wasserbade zurückgebliebenen Chloroformrückstand kontrolliert. Bevor die Versuche vorgenommen wurden, filtrierte ich die gelbe Flüssigkeit durch ein trockenes Filter, da immer vom heißen Wasser etwas Indigorot mitgeschleppt wird, was bei dieser Behandlung im Filter hängen bleibt.

Bei den vielen Menschenharnen, welche auf diese Weise untersucht wurden, ließ sich fast nie eine deutlich wahrnehmbare und nur einige Male eine noch gut wahrnehmbare Indopheninreaktion feststellen. Da in den einzelnen positiven Fällen die Indigorotprobe mit Indoxyllösungen (siehe oben) negativ ausfiel, hätte man also zu schließen, daß bei

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 12, S. 1311.

diesen Proben das gelbe Waschwasser nur zwischen $\frac{1}{10}$ und $\frac{1}{200}$ mg Isatin enthielt.

Dagegen wurde immer eine deutliche Indopheninreaktion wahrgenommen, als eine 38%ige Indoxylpasta direkt mit Ferrichloridsalzsäure versetzt wurde; es scheint also, daß die Verdünnung der Salzsäure durch das Filtrat, bei der Harnindicanbestimmung, von bedeutendem Einfluß auf diesen Vorgang ist.

Das gelbe Waschwasser ist demnach keine wässrige Lösung von Isatin, auch wenn es ab und zu Spuren von dieser Substanz enthält, und es geht also nicht an, den Verlust an Indigo bei der Wang-Obermayerschen Methode einer Überoxydation des Indoxyls zu Isatin zuzuschreiben, wie es Ellinger¹⁾ getan hat.

Ich erhielt einen ähnlichen gelben wässrigen Auszug, auch wenn eine alkoholische Lösung von reinem Indoxyl der spontanen Oxydation an der Luft überlassen wurde; nach Verdunsten des Alkohols ließ sich die gelbe Substanz von dem trockenen Rückstand mittels heißen Wassers auswaschen.

In diesem Falle kann man es nicht mit Isatin zu tun haben, da Indigo sich an der Luft nicht zu Isatin oxydiert; außerdem ist in dieser gelben Substanz mittels der Indophenprobe kein Isatin nachzuweisen. Die Entstehungsweise dieser gelben Substanz aus reinem Indoxyl weist entschieden darauf hin, daß sie etwas mit den Indigokörpern zu tun hat, und es liegt daher der Gedanke nahe, daß hier vielleicht ein Körper vorliegt, der dem vor vielen Jahren von Crinsoz aus Bengalindigo krystallinisch erhaltenen Indigogelb analog ist.²⁾

Leider war die von diesem Forscher erhaltene Menge zu klein, um sie einer eingehenden Untersuchung zu unterwerfen.

In der Literatur findet man über das sogen. Indigogelb nur sehr spärliche Angaben. Indessen überzeugen die von Crinsoz angegebenen Eigenschaften, daß er es nicht mit

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 186.

²⁾ Schweizerische Polytechnische Zeitschr., Bd. 11, S. 121.

Isatin zu tun hatte. Seine Kryställchen zeigten eine Sublimationstemperatur von ungefähr 130° C. während das Isatin erst über 200° C. verflüchtigt; auch andere Proben (siehe unten) stimmen nicht mit den Isatinreaktionen überein.

Wiewohl ich aus der gelben Lösung einzelne Kryställchen, mit amorpher Substanz vermischt, erhalten habe, war es mir nicht möglich, ein rein krystallinisches Produkt darzustellen, und ich mußte mich also damit begnügen, die verschiedenen angegebenen Reaktionen anzustellen.

Aus der untenstehenden Tabelle geht hervor, daß die Eigenschaften aller erwähnten Gelbarten ziemlich miteinander übereinstimmen; dagegen zeigen die Isatinreaktionen eine bedeutende Abweichung von denen der gelben Substanzen.

In welchem Verhältnis diese gelbe Substanz zu den Indigokörpern steht, vermag ich nicht zu entscheiden. Die Hauptsache für die Indicanbestimmung ist jedenfalls, wieviel Chamäleon dieser Körper, nachdem er in Schwefelsäure aufgenommen ist, bei seiner Oxydation verbraucht.

Zuerst habe ich aber festgestellt, daß die Schwefelsäurelösung, in Wasser gegossen, das Chamäleon sofort entfärbt; der bräunlich-gelbe Farbenton der Flüssigkeit blaßt sich dabei ab zu einer blaßgelben Farbe. Ich verbrauchte für die Titrierung von 4,4 mg dieser Substanz 5,6 ccm Chamäleon, entsprechend $5,6 \times 0,6 = 3,36$ mg Indigo. Das ist zwar etwas zu wenig, aber man soll nicht vergessen, daß die Endreaktion sich nicht genau feststellen läßt.

Ich erhielt diese 3,36 mg der gelben Substanz aus 1½ l Harn, welche titrimetrisch 48,7 mg Indigo ergaben, also $\frac{3,36 \times 100}{48,7 + 3,36} = 6,4\%$ der ganzen Menge.

Ich halte es demnach für nicht richtig, den Chloroformrückstand mit heißem Wasser abzuwaschen; dagegen ist das Erhitzen des Rückstandes notwendig, da hierdurch sich öfters absetzende farblose Kryställchen entfernt werden.

Ich empfehle demnach:

1. Fällung des sauren Harns mit $\frac{1}{10}$ Volumen Bleiessig.

2. Sofortige Ausschüttelung mit Chloroform mit einer nochmaligen Ausschüttelung nach $\frac{1}{2}$ Stunde.

3. Die Chloroformauszüge sofort in Aq. dest. ablaufen zu lassen und hiermit zu reinigen.

4. Den Chloroformrückstand $\frac{1}{2}$ Stunde auf dem kochenden Wasserbade zu erhitzen.

5. Titrierung mit Chamäleonlösung, welche auf Indigorein gestellt ist, bis zum Schwund der roten Nuance.

Eigenschaften	Gelb von Crinsoz	Gelb aus Indoxyl	Gelb aus Harn	Isatin
Löslichkeit in Wasser	Heiß—leicht Kalt—schwer	Heiß—leicht Kalt—schwer	Heiß—leicht Kalt—schwer	Heiß—leicht Kalt—schwer
Reaktion der wässer. Lösung	neutral	neutral	neutral	neutral
Löslich in konz. Schwefelsäure	Ja. Farbe?	Ja. Gelb-braun	Ja. Gelb-braun	Ja. Gelb
Sublimations-temperatur	$\pm 130^{\circ}$ C.	?	?	$\pm 200^{\circ}$ C.
Alkohol. Lösung + Ammoniak	unverändert	unverändert	unverändert	Rote Verfärbung
Trock. gelbe Substanz + Ätzlauge	Löslich. Farbe?	Löslich. Gelb	Löslich. Gelb	Löslich. Violett. Geht langsam ins Gelbe über
Indopheninprobe	?	negativ	negativ	positiv
Indoxylprobe	?	negativ	negativ	positiv

Für die Beantwortung der von Ellinger in seiner Abhandlung gelieferten Kritik über meine Methode zur Bestimmung des Harnindicans als Indigorot mittels Isatinsalzsäure werde ich ausschließlich Tatsachen und Zahlen benutzen, welche von mir

in den Jahren 1899, 1900 und 1901 in dieser Zeitschrift und 1902 in der Deutsch. Med. Wochenschr. publiziert sind.

Ellinger sagt,¹⁾ daß er meine titrimetrische Methode nicht kontrolliert hat, weil die Lösungen der Indigorotschwefelsäure nur selten klar waren; etwas früher, auf Seite 193 unten, sagt derselbe Forscher: «Die blaue Lösung war fast stets vollständig klar, geringe Trübung erschwert das Erkennen des Endpunktes der Titration, macht die Bestimmung aber nicht unmöglich.»

Bemerken wir nun, daß der Endpunkt der Titration für beide Methoden ist: das Verschwinden des roten Farbentons in einer gelben Lösung, dann begreife ich nicht, daß es für die eine Methode ein unüberwindliches Hindernis abgibt, während es für die andere Methode die Bestimmung des Endpunktes nur «erschwert». Obendrein gibt Ellinger zu, daß die Blaumethode auch ab und zu trübe Sulfolösungen ergibt; das ist aber bei beiden Methoden der Fall, wobei zu bemerken ist, daß es keine Regel, sondern Ausnahme ist.

Da ich aber überzeugt war, daß die Titration, wiewohl nicht unmöglich, doch behindert wird bei Trübung der Lösung, habe ich empfohlen,²⁾ durch ein trockenes Filter zu filtrieren, das zuerst Durchgelaufene nicht zu verwenden und die Titrierung vorzunehmen mit einem aliquoten Teil der nachher durchgelaufenen Flüssigkeit.

Auf diese Weise fand ich bei zahlreichen Kontrollbestimmungen mit Indigorein über 99% des verwandten Indigos zurück. Von «ganz unsichere Werte» durch diese Vorschrift kann also keine Rede sein.

Außerdem muß ich diesen Forscher darauf aufmerksam machen, daß er selbst seine Indigoblaulösung durch ein trockenes Filter filtriert, ohne sich dabei auf irgend eine Weise vor Verlust zu schützen, indem er sagt:³⁾ «Die abgelassenen Chloroformlösungen bleiben einige Minuten im Kölbchen stehen

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 195.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 85.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 193.

und werden durch ein trockenes Filter in einen trockenen sorgfältig gereinigten Kolben filtriert.» Bei dieser Prozedur bleibt ein nicht unansehnlicher Prozentgehalt an Indigo im trockenen Filter hängen, was von Ellinger weiter nicht beachtet wird.

Was nun die Ergebnisse beider Methoden anbetrifft, so muß ich folgendes hervorheben.

Bei Kontrollbestimmungen im Harn fand Ellinger zurück:¹⁾

bei Kontrollbestimmung	I	87,65 ⁰ / ₀
»	»	II 83,84 »
»	»	III 90,17 »
»	»	VI 85,63 »
		347,29 ⁰ / ₀

$$\text{also im Durchschnitt } \frac{347,29}{4} = 86,8\%.$$

In meiner Arbeit über die Indicanbestimmung als Indigorot habe ich betont,²⁾ daß die Ausbeute an Indigorot immer mehr beträgt als das Doppelte der Menge an Gesamt-Indigofarbstoffen. Ich befolgte die von mir modifizierte Methode Wang-Obermayer, ohne Waschprozeduren, fällte den Harn mit Bleiessig, bei einer Oxydationsdauer von $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde und Erhitzen des Chloroformauszuges auf 110° C. während 2 Stunden.

Verlust an Indigo ist also bei diesen Proben, nach dem Erwähnten, ganz ausgeschlossen, während etwaige zu hohe Werte in der nachfolgenden Berechnung im Nachteil der Resultate meiner Methode kommen werden.

In acht Versuchsreihen wurde der Totalgehalt an Gesamt-Indigofarbstoffen mit dem Ertrag an Indigorot verglichen, wobei man also erstere Zahlen mit 2 multiplizieren muß.

Die Ergebnisse waren folgende:

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 191—192.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 85—88.

Versuch	Gesamt-Indigofarbstoffe	Indigorot
I	3,56 mg	7,76 mg
II	4,90 »	10,38 »
III	3,19 »	7,01 »
IV	3,45 »	8,00 »
V	3,50 »	7,80 »
VI	3,27 »	7,51 »
VII	3,94 »	8,72 »
VIII	2,25 »	5,19 »
	$28,06 \times 2 = 56,12$ mg	62,37 mg

Ellinger erhielt an Total-Indigofarbstoffen 86,8%; berechnet nach dem obigen Verhältnis zwischen Total-Indigofarbstoffen und Indigorot bekommt man:

$$56,12 : 62,37 = 86,8 : 96,4.$$

Nach diesen von früheren Untersuchungen herstammenden Zahlen würde der Ertrag an Indigo nach meiner Indigorotmethode 96,4% der berechneten Menge betragen haben. Umgekehrt: ergibt die Indigorothe methode 100%, dann erhielt ich an Total-Indigofarbstoffen nach der oben erwähnten von mir modifizierten Methode Wang-Obermayer:

$$62,37 : 56,12 = 100 : 90$$

also 90% der berechneten Menge.

Doch nun genug von der titrimetrischen Indicanbestimmung; die Indigorotmethode erweist sich in keiner Hinsicht umständlicher als die Indigoblaumethode, im Falle man sich bei letzterer auch vor Verlusten schützt.

Was ihre Genauigkeit anbetrifft, so verweise ich auf die oben zitierten Zahlen und Berechnungen; für die Titrierung mache ich nochmals aufmerksam auf die z. Z. gegebene Vorschrift,¹⁾ während die Chamäleonlösung entweder auf synthetisches, reines Indigorot der Bad. Anilin- u. Soda-Fabrik oder auf sublimiertes Indigorot von Baeyer (Elberfeld) gestellt wurde.²⁾

Beide Methoden haben keinen großen Wert, da sie für klinische Zwecke zu umständlich sind und für rein wissen-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 84—85.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 89—90.

schaftliche Zwecke wohl kaum in Betracht kommen können. Was kann es einer wissenschaftlichen Untersuchung der Fäulnisprodukte des Darmes nützen, wenn man nur ein Fragment eines unbekanntes Ganzen (Total-Ätherschwefelsäure) bestimmt, besonders da kein bestimmtes Verhältnis der Indoxylschwefelsäure zu den Total-Ätherschwefelsäuren im Harne besteht.

Ich hoffe, im nächsten Wintersemester in dieser Zeitschrift näheres über eine neue titrimetrische Bestimmung der Gesamt-Ätherschwefelsäure mitteilen zu können.

Was nun zum Schluß meine kolorimetrische Bestimmung des Harnindicans als Indigorot anbetrifft, kann ich mich kurz fassen und brauche eigentlich nicht weiter zu gehen, als die von Ellinger selbst gefundenen Werte zu wiederholen¹⁾ und meine 1901²⁾ publizierten Zahlen hinzuzufügen:

	Titrimetrisch:		Kolorimetrisch:	
Ellinger: I.	14	mg	Zwischen 10 und 15	mg
» II.	11	»	» 10 » 15	»
» III.	32	»		30 »
» IV.	5	»	unter	5 »
Bouma: I.	7,6	mg	zwischen 5 und 10	mg
» II.	33	»	» 30 » 40	»
» III.	32,5	»	etwas über	30 »
» IV.	17,6	»	zwischen 15 und 20	»

Was die abweichende Reaktion (violett bis blau), worüber ich im vergangenen Winter näheres publiziert habe³⁾ anbetrifft, so wird man an den Kliniken, wo mein Indicanurometer gebraucht wird, schon erfahren haben, daß dieselbe sehr selten vorkommt, und daß man für diese seltenen Fälle mit der von mir angegebenen einfachen Behandlung des Harnfiltrats mit Schwefelwasserstoff durchaus auskommt, da man danach immer einen reinen, roten Chloroformauszug bekommt, welcher ohne Schwierigkeit mit den Standardröhrchen verglichen werden kann; Verlust an Indigo findet bei dieser Behandlung nicht statt.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 196.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 92.

³⁾ Deutsch. med. Wochenschr., 1902, Nr. 39.

In einer neulich erschienenen Arbeit von Ellinger und Prutz¹⁾ über den Einfluß von mechanischen Hindernissen im Dünndarm und im Dickdarm auf die Indicanausscheidung beim Hunde sagen diese Autoren: «Der ungefähren Schätzung des Indicangehaltes wären solche Anstiege der Indigomengen, wie in Versuch 7 und 13 konstatiert wurde, wohl leicht entgangen und wir möchten an der Hand dieses Beispiels auf den Wert der jetzt bequem und sicher auszuführenden quantitativen Indicanbestimmungen (titrimetrische Indigoblaumethode) auch in der klinischen Praxis hinweisen.»

Beim Nachschlagen dieser Versuche 7 und 13 erfährt man, daß bei diesen Versuchen die Probelaparotomie beim Hunde vorgenommen wurde, auf Grund des Verdachtes auf Insufficienz der Ileocoecalklappe nach den folgenden Anstiegen der täglichen Indicanmengen:

Probe 7. 26./27.—27./28. Juni, von **17,0** auf **45,24** mg.

Probe 13. 15./16.—16./17. Juli, von **25,0** auf **43,7** mg.

An der Hand obiger Resultate der kolorimetrischen Indigorotmethode, glaube ich mit Bestimmtheit schließen zu dürfen, daß solche und auch viel geringere Anstiege der Wahrnehmung beim Befolgen dieser Methode nicht entgangen sein sollten. Durch diese Methode ist es nicht nur in den Laboratorien der Kliniken, sondern auch jedem praktischen Arzt möglich, sich leicht von den Fäulnisprozessen im Darne seiner Patienten eine ziemlich genaue Vorstellung zu machen. Wenn man dabei bedenkt, daß diese Bestimmung 5 Minuten in Anspruch nimmt und daß ich sie ausschließlich als eine klinische Methode bezeichnet habe, so glaube ich, daß jeder Kliniker mit den oben erwähnten Resultaten zufrieden sein wird, umsomehr, als die meisten Kliniker sich bis jetzt mit den Angaben: schwach, mittelstark und stark begnügen mußten.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 425.
