

Einige strittige Punkte bei der quantitativen Indikanbestimmung im Harn.

Entgegnung an J. Bouma und L. C. Maillard.

Von

Alexander Ellinger.

(Aus dem Universitätslaboratorium für medizinische Chemie und experiment.
Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)
(Der Redaktion zugegangen am 1. Januar 1904.)

Eine Reihe von Behauptungen über die Entstehung des Indikans im Tierkörper auf anderem Wege als dem der bakteriellen Zersetzung war die Veranlassung, daß im hiesigen pharmakologischen Institut die gesamte Indikanfrage einer gründlichen Prüfung unterzogen wurde. Die erste Vorbedingung einer solchen Untersuchung war natürlich eine Methode der quantitativen Indikanbestimmung, welche zuverlässige Resultate gab. Auf der Suche nach einer solchen Methode in der Literatur fand ich zwar eine recht stattliche Reihe von Bestimmungsweisen bis in die kleinste Einzelheit ausgearbeitet: Bestimmungen, welche auf gravimetrischer, titrimetrischer, kolorimetrischer und spektrophotometrischer Methodik beruhten; aber kein einziger der zahlreichen Vorschläge war darauf geprüft, ob danach eine dem Harn zugesetzte Menge reinen Indikans vollständig oder wenigstens mit einem konstanten Verluste wiedergefunden würde.

So blieb mir nichts anders übrig, als selbst diese Prüfung vorzunehmen, welche seit der Reindarstellung des indoxylschwefelsauren Kaliums durch Baumann Pflicht eines jeden gewesen wäre, der eine neue Methode zur quantitativen Indikanbestimmung vorschlug.¹⁾ Meine Absicht war es also nicht,

¹⁾ Da wir über eine Methode zur Reindarstellung indoxylglykuronsaurer Salze zur Zeit nicht verfügen, mußte sich die Prüfung auf Lösungen des indoxylschwefelsauren Salzes beschränken.

eine neue eigene Methode den zahlreichen in Vorschlag gebrachten hinzuzufügen, noch weniger diese sämtlich nachzuprüfen, sondern es kam mir nur darauf an, die bisher in der Literatur niedergelegten Erfahrungen mit Auswahl so zu verwerten, daß die daraus abgeleiteten Vorschriften brauchbare Vergleichswerte lieferten, und die Fehlergrenzen der gefundenen Werte zu bestimmen.

Da bei der Prüfung der Indikanfrage in erster Linie Experimente an Tieren, namentlich solche an Hunden, in Betracht kamen, so mußte die Methode vor allem an Hundeharn geprüft werden. Zugleich mußte sie aber auch für den Menschenharn zuverlässige Werte geben, da die klinische Verwertung der Lehre von der Indikanbildung ebenso sehr in Betracht gezogen werden sollte, wie deren rein biochemische Seite.

Die Erfahrungen, welche wir im hiesigen Institut bei der Anwendung verschiedener Methoden machten und von welchen einiges in der Inauguraldissertation von H. Scholz¹⁾ kurz erwähnt ist, veranlaßte uns dazu, in der Hauptsache den Vorschriften von Wang-Obermayer zu folgen, dabei aber teils Modifikationen entsprechend den Vorschlägen von Bouma in Anwendung zu bringen, teils eigene Erfahrungen zu neuen Modifikationen zu verwerten. So entstand die Methode, wie ich sie im XXXVIII. Band dieser Zeitschrift²⁾ mitgeteilt habe. Sie ist an reinen, wässerigen Indikanlösungen sowie an Menschen- und Hundeharnen, welchen reines Indikan zugesetzt war, geprüft worden, und es stellte sich heraus, daß etwa 86% der berechneten Menge Indikan wieder gefunden wurden.

Daß eine Methode, die mit so großen Verlusten arbeitet, den idealen Anforderungen an eine quantitative Bestimmung nicht genügt, ist unzweifelhaft. Trotzdem erschien sie mir für die vorliegenden Zwecke ausreichend, da sich der Fehler in einer ansehnlichen Reihe von Kontrollbestimmungen als nahezu konstant erwies.

¹⁾ Harry Scholz, Beiträge zur Frage der Entstehung des Indikans im Tierkörper, Inaug.-Diss., Königsberg, 1903, S. 10—15.

²⁾ A. Ellinger, Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 178.

Erst in zweiter Linie kam für die Praxis des Harnanalytikers die Frage in Betracht, wodurch der Verlust an Indigo bei dem angewandten Bestimmungsverfahren bedingt werde. Aber ich zog auch diese Frage in den Bereich meiner Untersuchungen und konnte zeigen, daß bei Einwirkung von Obermayers Reagens auf Indikan Isatin entstände, und daß dieses durch Überoxydation des Indoxyls gebildete Isatin sich selbst dann nachweisen ließ, wenn die entstandene Menge Indigo nur 2 mg betrug.

Das gleichzeitige Vorhandensein von Isatin und Indoxyl in der salzsauren Lösung führt bekanntlich zur Bildung von Indigorot, und ich habe deshalb darauf hingewiesen, daß dieser Vorgang eine der Quellen der Indigorotbildung sein könne, welche stets bei der Überführung des Indikans in Indigo mittels der Eisenchloridsalzsäure von anderen Autoren, wie von mir, beobachtet wurde. Ausdrücklich wurde hervorgehoben, daß auch aus bereits fertig gebildetem Indigoblau beim Abdestillieren der Chloroformlösungen roter Farbstoff entstehe, die Beobachtung anderer Autoren von dem Farbenumschlag der Chloroformlösungen also bestätigt, eine Beobachtung, welche wohl noch niemandem bei Ausführung einer Indikanbestimmung nach der alten Wangschen Methode entgangen ist.

Zu dieser Rekapitulation sehe ich mich gegenüber der Kritik von Bouma¹⁾ und den Angriffen von Maillard²⁾ gegen meine Arbeit genötigt. Nach den Ausführungen Boumas kann der Leser annehmen, ich hätte bei der Indigorotbildung auf die Synthese aus Isatin und Indoxyl das Hauptgewicht gelegt und die «Umlagerung» oder, wie man diesen noch keineswegs völlig aufgeklärten Vorgang nennen will, als nebensächlich hingestellt.

Wenn ich von unwesentlichen Ausstellungen absehe, welche mir zu einer Erwiderung nicht hätten Veranlassung

¹⁾ J. Bouma, Nachtrag zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 356.

²⁾ L. C. Maillard, L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent, Paris 1903.

geben können,¹⁾ so sind die Anklagepunkte der genannten Autoren gegen meine Behauptungen und Vorschläge die folgenden:

1. Die Überoxydation des Indoxyls zu Isatin ist von mir übertrieben worden. (Bouma.)

2. Die Überoxydation durch Obermayers Reagens geht bei reinen und verdünnten Lösungen von indoxylschwefelsaurem Salz (0,02 g und darunter im Liter) viel weiter, als ich annahm. Der Verlust beträgt dann 100%, d. h. man erhält mit dem Reagens überhaupt keine Indigolösung. (Maillard, l. c. S. 31 und 70, 71.)

3. Der Chloroformrückstand, welcher die Indigofarbstoffe enthält, darf nicht, wie ich vorgeschlagen habe, mit heißem Wasser ausgewaschen werden, weil auf diese Weise «Indigo-gelb» entfernt und der Titration entzogen wird. (Bouma.)

4. Die Kenntnis von Maillards Veröffentlichungen aus den Jahren 1901 und 1902, welche ich nicht zitiert habe, hätte mich vor «der konfusen Darstellung und den irrigen Behauptungen» über die Rolle des Isatins bei der Bildung von Indigorot in dem Harngemisch bewahren können. (Maillard.)²⁾

Auf Punkt 1 und 2 kann ich zugleich erwidern: Die von mir zuerst beschriebene Beobachtung, daß Isatin bei der Spaltung und Oxydation des indoxylschwefelsauren Kaliums mit Eisenchloridsalzsäure entsteht, ist sowohl von Bouma wie von Maillard bestätigt worden. Über die Mengenverhältnisse des entstehenden Isatins habe ich nur ausgesagt, daß der Verlust an Indigo jedenfalls zum großen Teile durch eine Überoxydation des Indoxyls zu Isatin bedingt sei. Der von Bouma zitierte

¹⁾ In der Frage der Ausschüttelung z. B. wird es natürlich richtig sein, wenn nach halbstündigem Stehen noch Indigo ins Chloroform geht, diesen Auszug den ersten zuzufügen. Mir kam der Fall fast niemals vor, wahrscheinlich weil in den Filtraten von der Bleifällung zumeist kein störender Bleiüberschuß vorhanden war, dessen Einfluß Bouma in einleuchtender Weise erörtert hat. Weitaus die Mehrzahl meiner Bestimmungen wurden am Hundeharn gemacht.

²⁾ l. c., S. 34. Il est d'ailleurs regrettable que A. Ellinger ignore mes publications de 1901 et 1902, dont la connaissance lui eût évité des pages confuses et des affirmations erronées, telles que le rôle de l'isatine dans la formation de l'indirubine au sein du mélange urinaire.

Satz: «Unter den angewandten Bedingungen scheint aber überhaupt außer dem Isatin kaum eine andere Beimengung ins Chloroform überzugehen», bezieht sich, wie der Zusammenhang deutlich genug ergibt, auf Phenol und Oxysäuren, welche in den zitierten Fällen nicht nachgewiesen werden konnten.

Seine quantitativen Untersuchungen haben nun Bouma zu der Erklärung geführt, daß die entstehende Isatinmenge minimal sei. Es ist hier natürlich nur von solchem Isatin die Rede, das nicht mit noch unoxydiertem Indoxyl zu Indigorot zusammentritt; denn nur das nach beendeter Ausschüttelung frei vorhandene Isatin kommt als Verlust in Betracht, vorausgesetzt, daß Isatin und Indoxyl in salzsaurer Lösung sich quantitativ zu Indigorot vereinigen.¹⁾ Von diesem nachweisbaren Isatin habe ich seiner Zeit jedenfalls erheblich mehr als Bouma erhalten. Sonst wäre es mir wohl nicht gelungen, aus den gesammelten Waschwassern von höchstens 30—40 Chloroformrückständen indikanreicher Hundeharne, welche zusammen vielleicht 0,1 g Indigo enthielten, so viel Isatin zu gewinnen, um es in Form des Phenylhydrazons zu charakterisieren.

Mir scheint, daß die Mengenverhältnisse des nachweisbaren Isatins schwanken nach Bedingungen, welche noch nicht genügend erforscht sind. Das Isatin kondensiert sich, wie bekannt ist, sehr leicht nicht nur mit dem Indoxyl und dem Thiophen, sondern auch mit Phenolen,²⁾ Ketonen und anderen Substanzen in Gegenwart konzentrierter Säuren. Ist erst einmal eine solche Kondensation eingetreten beim Aufnehmen des zu prüfenden Waschwasserrückstandes mit konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure, so darf es nicht wundernehmen, wenn nachher die Kondensation zu Indophenin oder Indigorot nicht mehr gelingt. So erklären sich vielleicht manche negativen Befunde Boumas aus der Kondensation des Isatins mit andern im Wasch-

¹⁾ Ob diese Synthese wirklich quantitativ nach der Formel verläuft, ist, soweit mir bekannt ist, noch nicht festgestellt. Die Mitteilung von Beijerinck, auf welche sich Bouma bezieht, war mir nicht zugänglich. Forrer (Ber. d. chem. Ges., Bd. XVII, S. 975) erhielt aus Indoxyl und Isatin unter Sodazusatz nur 78% der theoretischen Ausbeute.

²⁾ Von dem störenden Einfluß des Phenols auf die Indopheninprobe habe ich mich wiederholt überzeugt.

wasser vorhandenen Stoffen, so erklärt es sich vielleicht auch, daß ihm die Indopheninprobe in den Rückständen besser gelang, wenn er erst thiophenhaltiges Benzol und dann Schwefelsäure zusetzte.

Woran es liegt, daß Bouma mit reinem Isatin die Indopheninprobe nach der Baeyerschen Vorschrift nicht gelang, ist mir schwer verständlich. Mir hat diese Probe nie versagt, wenn ich mich an die detailliertere Angabe von Baeyer und Lazarus¹⁾ hielt, wonach eine 1%ige Lösung von Thiophen in Benzol mit einer Auflösung von Isatin in 20—30 Teilen kalter, 65grädiger Schwefelsäure 2 Minuten kräftig durchgeschüttelt wird.

Ich habe nach dem Erscheinen von Boumas Mitteilung noch wiederholt Waschwasser, die von Indikanbestimmungen in normalem Hundeurin stammten, auf Isatin untersucht und die Indopheninprobe fiel positiv aus, obwohl die Indigomenge recht gering war. Bei einem Rückstand aus normalem Menschenharn ergab die Indopheninprobe keine reine Färbung. Da konnte ich mich aber durch Zusatz von reinem Isatin zu der schwefelsauren Lösung überzeugen, daß die Probe auch dann nicht gelang, daß also die Reaktion störende Verunreinigungen zugegen sein mußten.

Weiterhin ist zu bedenken, daß dreimaliges Ausschütteln mit Chloroform nicht genügt, um kleine Isatinmengen, welche in großen Quantitäten Salzsäure gelöst sind, quantitativ ins Chloroform überzuführen. Ich habe, um mich davon zu überzeugen, folgenden Versuch angestellt: 20 ccm der von Bouma zur Indikanbestimmung verwendeten Isatinsalzsäure, welche 0,4 mg Isatin enthielten, wurden mit 80 ccm Obermayerschem Reagens und 100 ccm Wasser dreimal wie bei der Indikanbestimmung mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Chloroformrückstand gab die Indopheninprobe. Nach weiterem dreimaligen Ausschütteln wurde abermals ein Rückstand erhalten, welcher eine schöne Indopheninreaktion lieferte.

Nach dem Gesagten halte ich mich für berechtigt, zu erklären, daß weder der negative Ausfall der Indopheninprobe noch der Indigorotsynthese die Abwesenheit von Isatin in dem

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XVIII, S. 2637, 1885.

Waschwasser des Chloroformrückstandes beweist, und daß es unmöglich ist, nach dem von Bouma gewählten Verfahren die Menge des gebildeten Isatins zu beurteilen.

In schroffstem Gegensatz zu Bouma behauptet Maillard, der ebenfalls meine Beobachtung der Überoxydation des Indoxyls zu Isatin durch Obermayers Reagens bestätigt hat, daß bei reinen verdünnten Lösungen von indoxylschwefelsaurem Kalium die Überoxydation bis zu 100% betragen könne.

Maillard erhielt, wenn er seine reine Lösung, welche 0,02 g des Salzes in 1 Liter Wasser enthielt, mit dem gleichen Volumen Eisenchloridsalzsäure versetzte, keine Spur Indigo, und er verwirft deshalb prinzipiell den Gebrauch eines Oxydationsmittels bei der Spaltung reiner Lösungen. Er empfiehlt vielmehr, wie auch bei der Bestimmung im Harn, konzentrierte Salzsäure allein zuzusetzen und mit Luft tüchtig zu schütteln, um die Oxydation zu Indigo zu bewirken.

Ich habe an Lösungen des gleichen Salzes, welches mir zur Prüfung der Methode gedient hatte, die Versuche von Maillard wiederholt und gefunden, daß nicht nur Lösungen von 1 und 2 cg in 1 Liter, sondern noch solche von 2 mg eine deutliche Blaufärbung des Chloroforms ergeben, wenn man die Probe im Reagensglas in der üblichen Weise anstellt. Lösungen von 1 mg in 1 Liter Wasser färbten das Chloroform noch schwach blau, wenn man 100 ccm davon mit der gleichen Menge des Reagens und nur 10 ccm Chloroform schüttelte. Wurde statt des Obermayerschen Reagens reine Salzsäure verwandt, so konnte ich schon aus der Lösung von 2 mg im Liter keine Spur einer Färbung erhalten. Das Chloroform nahm selbst nach 24 stündigem Stehen und wiederholtem Schütteln weder einen blauen noch einen rötlichen Ton an. Ich fand also im Gegensatz zu Maillard das Obermayersche Reagens der reinen Salzsäure bei der Prüfung sehr verdünnter Lösungen überlegen. Wenn Maillard bei Lösungen von 2 cg in 1 Liter keine positive Obermayersche Probe erhielt, so kann das nur daran gelegen haben, daß er kein reines indoxylschwefelsaures Kalium in den Händen hatte. Die stimmende Stickstoffbestimmung in 0,0614 g des Salzes gibt keine Garantie für die Reinheit seiner Substanz.

Damit fällt der einzige wesentliche Einwand von Maillard gegen das von mir geübte und kontrollierte Bestimmungsverfahren. Denn wenn er außerdem behauptet, daß selbst die mit heißem Wasser ausgewaschenen Indigofarbstoffe nach dem Wiederauflösen in Chloroform noch Verunreinigungen an Wasser oder alkalisches Wasser abgeben, so zeigen meine Vergleichsbestimmungen an reinen Indikanlösungen und Harnen mit Indikanzusatz, daß die durch diese Verunreinigungen bedingten Fehler, wenn man die von mir angegebenen Vorschriften befolgt, innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegen.¹⁾

¹⁾ An einer zur Polemik wenig geeigneten Stelle (Eulenburgs Enzyklopädische Jahrbücher der ges. Heilkunde, Neue Folge, 2. Bd., Artikel: Indikanurie) behauptet Blumenthal, daß die Behandlung des Kaninchenharns nach meinen Angaben zum Zwecke der Indikanbestimmung zu braunen Schmierens führte. Ich habe in sehr zahlreichen Bestimmungen, ebenso wie die im hiesigen Institute arbeitenden Herren Scholz und Gentzen, fast ausnahmslos klare blaue Lösungen erhalten und habe überdies die titrimetrischen Bestimmungen durch kolorimetrische kontrolliert. Die gute Übereinstimmung schloß eine in Betracht kommende Verunreinigung der Indigofarbstoffe durch Permanganat reduzierende Substanzen aus. Außerdem habe ich mich überzeugt, daß die Tagesmenge eines indikanfreien Kaninchenharns nach Rübenfütterung, in der gleichen Weise wie bei der Indikanbestimmung behandelt, einen nur minimalen Rückstand hinterläßt. Löst man denselben in konzentrierter Schwefelsäure und setzt ihn einer Indigosulfosäurelösung von bekanntem Gehalt zu, so entspricht der Mehrverbrauch im höchsten Falle noch nicht 0,2 mg Indigo für das ganze Tagesquantum — ein Fehler, der nicht ins Gewicht fällt.

Ich benutze diese Gelegenheit, um lebhaft gegen die Art zu protestieren, in der Blumenthal in einer Enzyklopädie die Indikanfrage nicht referierend, sondern polemisch behandelt. Er verschweigt in seinem Artikel die Resultate meiner Arbeit über die Indolbildung beim hungernden Kaninchen (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, Heft 1) vollständig. Und doch müssen ihm dieselben bekannt gewesen sein; denn aus Versehen zitiert er diese Arbeit, wo er meine Abhandlung über quantitative Indikanbestimmung (Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, Heft 1 u. 2) anführen wollte. Selbst wenn Blumenthal für seine Person meine Versuche nicht für beweiskräftig hielt, wie es nach dem letzten — meines Erachtens vollkommen mißglückten — Rettungsversuch seiner Anschauungen über Indikanurie durch seinen Mitarbeiter Rosenfeld den Anschein hat (Hofmeisters Beiträge z. chem. Phys., Bd. 5, S. 83), so konnte ihn das nicht von der Pflicht entbinden, die Resultate meiner Versuche, welche sich gegen das Fundament seiner Theorie richten, anzuführen.

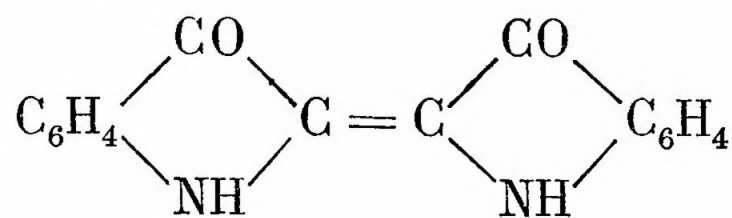
Auch in der Frage, wie die mit Chloroform ausgeschüttelten Indigofarbstoffe zu reinigen seien, sind — damit komme ich zu dem dritten der oben aufgezählten Anklagepunkte — Maillard und Bouma durchaus entgegengesetzter Meinung. Nach Maillard wasche ich, wie oben berichtet wurde, zu wenig, nach Bouma zu viel aus. Ich habe vorgeschlagen, den Chloroformrückstand mit heißem Wasser auszuwaschen, einmal um das Isatin, dann aber um etwaige sonstige lösliche Beimengungen zu entfernen, die dem Indigoblau und Indigorot anhaften konnten, wenn ich auch über deren Natur nichts aussagen konnte. Bouma glaubt nun behaupten zu dürfen, daß in dieser wässrigen Lösung Indigogelb vorhanden sei, daß man also einen Indigofarbstoff mit entferne, welcher aus dem Indikan des Harns stamme. Selbst zugegeben, daß in dem Waschwasser das bisher wenig scharf charakterisierte Indigogelb vorhanden sei, so darf man meiner Ansicht nach von dem Waschen mit heißem Wasser nicht absehen, weil die Möglichkeit für das Vorhandensein in Betracht kommender Isatinmengen und anderer Verunreinigungen des Chloroformrückstands, wie ich oben gezeigt habe, immer besteht, und weil bisher kein Versuch vorliegt, wie die Fehlergrenzen nach der Befolgung des Boumaschen Vorschlags sich gestalten würden. Die Endreaktion bei der Titrierung mit Permanganat soll der Übergang des roten Farbentons in den gelben sein. Titriert man die gelbe Lösung mit den Indigosulfosäuren, die man nach meinem Vorgehen erhält, so muß der Umschlag undeutlich werden, wie man das auch bei Bestimmungen nach dem alten Verfahren von Wang (ohne Auswaschen) beobachten kann. Wollte man übrigens dem Vorschlage Boumas folgen und den Chloroformrückstand nicht auswaschen, sondern nur eine halbe Stunde auf etwa 100° erhitzen, so wären wohl auch Verluste an Indigogelb zu befürchten; denn man darf kaum annehmen, daß eine Substanz, welche bei 130° sublimiert, bei längerem Erhitzen auf 100° ganz unverändert zurückbleibt.

Ich kann also nur raten, bei meinem unvollkommenen Modus procedendi mit dem ermittelten konstanten Fehler so lange zu bleiben, bis eine andre Methode mit reinem indoxyl-

schwefelsauren Kalium geprüft ist, welche geringere Verluste aufweist. Die indirekten Vergleichsberechnungen, welche Bouma für seine titrimetrische Indigorot-Methode beibringt, sind einer solchen Prüfung keineswegs gleichwertig, ganz abgesehen davon, daß die Bedenken, welche Scholz und ich früher schon gegen diese Methode erhoben haben, sie in vielen Fällen einfach als unbrauchbar erwiesen.

Es erübrigt noch, meine Ansichten über die Bildung von Indigorot bei der Indikanbestimmung gegenüber den von Maillard aufgestellten Theorien zu begründen. Die Resultate von Maillards Versuchen aus den Jahren 1901 und 1902 waren mir bei Abfassung meiner Arbeit wohl bekannt, und ich habe sie nur aus dem Grunde nicht zitiert, weil mir die Einwirkung von Salzsäure ohne Zusatz eines Oxydationsmittels¹⁾ auf indikanhaltige Urine nicht direkt zur Sache zu gehören schien, und weil ich von der Unrichtigkeit der theoretischen Anschauungen Maillards über die Konstitution der Indigofarbstoffe²⁾ schon damals auf Grund eigener Beobachtungen überzeugt war. Ich hätte also meine wesentlich praktisch-analytischen Zwecken dienende Publikation durch theoretische Betrachtungen unnütz beschweren müssen.

Maillard hat sich von der Entstehung der verschiedenen Indigofarbstoffe bei der Spaltung und Oxydation der Indoxylschwefelsäure folgende Vorstellung gebildet: Der blaue Farbstoff, welcher bei der Obermayerschen Reaktion in das Chloroform geht, ist nicht identisch mit dem gewöhnlichen Indigotin. Er schreibt ihm die bisher nach Baeyers Vorgang für das Indigotin angenommene Formel

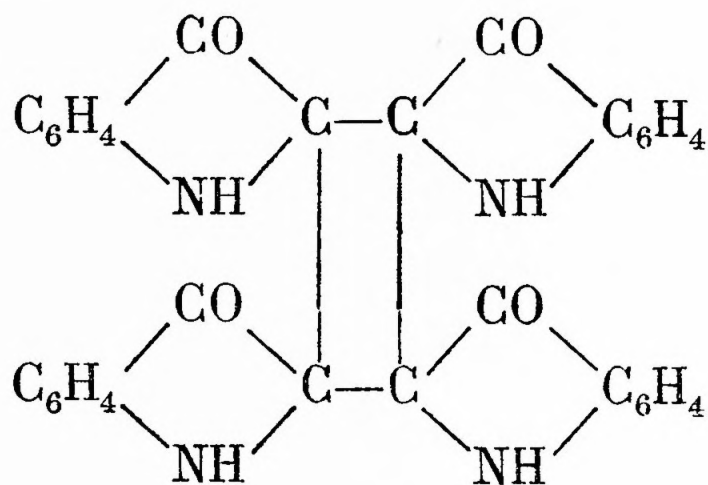


zu und bezeichnet ihn als Hemiindigotin. Aus diesem Hemiindigotin sollen durch Polymerisation Indigotin oder Indirubin entstehen können, je nach der Reaktion des Milieus, in welchem

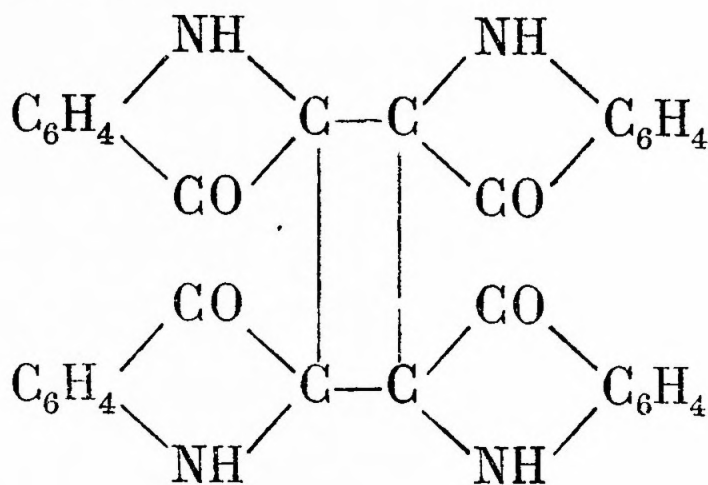
¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. sciences, Bd. 132, S. 990, 1901.

²⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. sciences, Bd. 134, S. 470, 1902, und spätere Abhandlungen.

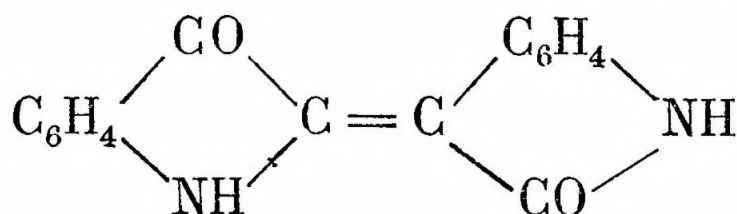
sich das Hemiindigotin befindet. Für Indigotin sowie für Indirubin nimmt Maillard die doppelte Molekulargröße in Anspruch und wählt auf Grund von Betrachtungen, welche er selbst nicht für unbedingt bindend ansieht, von den möglichen Formeln für den blauen Farbstoff die Formel:



für den roten die Formel:



während Baeyer dem Indigorot die Konstitution



zuschrieb.

Maillard stützt seine Theorie auf folgende Beobachtungen: Der beim Ausschütteln ins Chloroform übergehende blaue Farbstoff ist viel löslicher in Chloroform als reines Indigotin. Läßt man die blaue Lösung in dem salzsäurehaltigen Chloroform stehen, so wandelt sich allmählich der ganze Farbstoff in Indirubin um. Durch Erhitzen kann der Vorgang beschleunigt werden. Wäscht man dagegen die Chloroformlösung mit Wasser oder besser mit schwach alkalischem Wasser und fügt dann eine Spur festes Indigotin zu, so fällt Indigotin aus und die Färbung der Lösung nimmt ab. Dabei handelt es sich nach Maillard nicht um ein Phänomen der Übersättigung, denn Lösungen von Indigotin in heißem Chloroform zeigen gar keine Neigung zur Übersättigung, sondern lassen auch ohne Impfung nach einiger

Zeit das überschüssige Indigotin ausfallen. Da Lösungen von reinem Indigotin in Chloroform selbst nach Schütteln mit Salzsäure blau blieben, so erklärt Maillard die Gesamtheit seiner Beobachtungen durch die Annahme: Das zunächst entstehende Hemiindigotin polymerisiert sich in Gegenwart von Säure langsam zu Indirubin, nach Alkalisierung der Lösung schnell zu Indigotin. Als Stütze für seine Anschauung bringt er auch die Beobachtungen von Vaubel¹⁾ an, der für Indigoblau, in Toluidin- und Phenollösung, für Indigorot in Toluidinlösung auf kryoskopischem Wege das Molekulargewicht $C_{32}H_{20}N_4O_4$ fand.²⁾

Sehr viel einfacher lassen sich die Beobachtungen erklären, wenn man annimmt, daß Indigotin in salzsäurehaltigem Chloroform löslicher ist als in reinem Chloroform. Diese Annahme ist berechtigt, wie folgende Versuche beweisen:

Je 0,3 g synthetisches Indigoblau der Bad. Anilin- und Sodafabrik, welches ein wenig Indigorot enthielt, wurde mit je 100 ccm Chloroform eine Stunde im Schüttelapparat geschüttelt. Das Chloroform A war frisch aus der Apotheke bezogen und reagierte neutral, Chloroform B war vorher mehrere Minuten mit konzentrierter Salzsäure geschüttelt. Von jeder Lösung wurden 50 ccm abfiltriert; Lösung A zeigte einen fast rein blauen Farbenton, Lösung B einen deutlich violetten. Beim Abdestillieren des Chloroforms auf dem Wasserbad änderte sich in beiden Lösungen die Farbe, bei A wenig, B wurde rotviolett.

Der zurückbleibende Indigo wurde in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und titriert. Rückstand A verbrauchte in einem Versuche 28 ccm, in einem zweiten Versuche 30 ccm, Rückstand B in beiden Versuchen 41 ccm einer verdünnten Permanganatlösung.

Um von der titrimetrischen Bestimmung unabhängig zu sein, wurden in einem dritten Versuch 300 ccm Chloroform zur Lösung benutzt und von 250 ccm der abfiltrierten Lösung der Rückstand gewogen. Lösung A hinterließ **9,6** mg Indigo,

¹⁾ Chemikerzeitung, 1901, S. 725 und Zeitschr. f. Farben- und Textilchemie, Bd. 1, S. 39, zitiert nach Referat im Chem. Ztrbl.

²⁾ In Anilinlösung entsprach das Molekulargewicht der einfachen Formel $C_{16}H_{10}N_2O_2$.

Lösung B, deren Chloroform sehr energisch und lange mit Salzsäure geschüttelt war, 18,7 mg. Der violette Ton trat in der konzentrierten sauren Lösung in diesem Versuche weniger stark hervor als in den beiden oben angeführten, wenigstens in der Kälte; beim Erwärmen wurden die Unterschiede des Farbentons der sauren und der neutralen Lösung wieder höchst augenfällig.

Der Befund, daß Indigo in salzsäurehaltigem Chloroform leichter löslich ist als in neutralem, erklärt auch zwanglos das Ausfallen festen Indigos, sobald man durch Waschen mit Wasser oder verdünntem Alkali die Säure dem Chloroform entzieht.

Im Gegensatz zu Maillard habe ich übrigens bei meinen Indigolösungen, selbst wenn das Chloroform säurefrei war, beobachtet, daß beim Waschen mit Wasser sich Indigo fest abschied. Es liegt wohl am nächsten, diese Erscheinung darauf zurückzuführen, daß wasserhaltiges Chloroform weniger Indigo löst als wasserfreies.

Ob Lösungen von absolut reinem Indigotin sich, namentlich in bezug auf die Umwandlung in Rot, ebenso verhalten wie meine Lösungen, welche am Anfang etwas Rot enthielten, darüber habe ich keine eigene Erfahrung. Beobachtungen von Wang, Bouma und Maillard scheinen dagegen zu sprechen. Aber für das Verhalten der Chloroformlösungen bei der Indikanbestimmung kommt das absolut reine Indigotin gar nicht in Betracht, denn sie enthalten stets etwas Indigorot, und die Bildung dieses Farbstoffs, unabhängig von der des Indigotins, ist durch den Nachweis des Isatins bei der Oxydation des Indikans mit Obermayerschem Reagens befriedigend erklärt. Daß aber die Umwandlung leichter vor sich geht, wenn in der Lösung von dem Umwandlungsprodukt schon etwas vorhanden ist, ist gewiß eine durch das Vorkommen analoger Vorgänge hinreichend gestützte Annahme.

Es liegt also nicht der mindeste Grund vor, in dem blauen Farbstoff, den Maillard als Hemiindigotin bezeichnet hat, etwas anderes zu sehen als das altbekannte Indigotin. Ob diesem Körper die einfache oder die doppelte Formel zukommt, ist eine andere Frage, die durch Spekulationen wie die Maillards nicht entschieden werden kann.
