

Über das Chromogen des sogenannten Skatolrotes im normalen Menschenharn.

Von

J. Ph. Staal.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität in Utrecht.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. September 1905.)

I.

Zu den Harnfarbstoffen, welche fortwährend das Interesse der Untersucher auf sich gelenkt haben, gehören ohne Zweifel das Indigrot (bezw. -blau) und das Skatolrot, besonders auch deshalb, weil man sie als einen Maßstab gebrauchte bei der Beurteilung der Eiweißfäulnis im Darne. Während das Indigrot und sein Chromogen im Harn gut bekannt sind und eine umfangreiche Literatur (Baumann, Brieger, Rosin, Wang, Bouma, Ellinger, Maillard u. a.) über die Hauptsachen jeden Zweifel aufgehoben hat, ist die Natur des sogenannten Skatolrotes und seines Chromogens bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Zwar sind einige Autoren der Meinung zugetan, daß das Indigrot und das Skatolrot identische Farbstoffe seien, aber die Unlöslichkeit des sogenannten Skatolrotes in Chloroform spricht gegen diese Annahme.

Das Skatolrot erhielt diesen Namen bald nach der Entdeckung des Skatols, indem man die Skatoxylschwefelsäure als sein Chromogen im Harn betrachtete. Jedenfalls ist aus dem Harn ein roter Farbstoff darzustellen, welcher in Eigenschaften und Darstellungsweise mit einem aus Skatolderivaten herrührenden Farbstoff Ähnlichkeit zeigt. Die Identität dieser beiden Farbstoffe ist bis jetzt nicht nachgewiesen, wenn sie auch ziemlich allgemein angenommen wird und deshalb auch das sogenannte Skatolrot und die Skatolderivate eine gemeinsame Geschichte haben.

Bekanntlich entdeckte Brieger¹⁾ das Skatol im Destillat menschlicher Exkremente als einen neuen, kristallisierenden, bei 94–95° C. schmelzenden Körper mit fäkalem Geruch. Die Kristalle lösen sich schwieriger in Wasser als Indol. Mit HCl und Chlorkalk färbt das Skatol sich nicht rot. In der wässerigen Lösung entsteht durch rauchende Salpetersäure eine weiße Trübung. Brieger fand es niemals in Faeces von Hunden und Typhuspatienten. Nach subkutaner Injektion des Skatols bei Kaninchen fand er im Harn ein Chromogen, welches sich mit HCl und Chlorkalk rot oder violett färbte.

Analyse und Bestimmung der Dampfdichte führten Brieger²⁾ zu derselben Molekularformel wie Nencki:³⁾ C₉H₉N. Nach subkutaner Injektion bei Kaninchen und Fröschen trat eine Vermehrung der Ätherschwefelsäure auf.

Bald darauf entdeckte man das Skatol in den Fäulnisprodukten des Eiweißes: Brieger²⁾ bei Fäulnis von Bluteiweiß, Nencki³⁾ bei Fäulnis von Fleisch und Pankreas, E. und H. Salkowski⁴⁾ bei Fäulnis von Fleisch, Nencki⁵⁾ bei Fäulnis von Gehirn, Brieger⁶⁾ bei Fäulnis von Fibrin, Eiereiweiß, Leber, Casein.

Brieger⁶⁾ gab einem Hunde in 2 Tagen 7 g Skatol. Die Ätherschwefelsäuren waren um das Vierfache vermehrt. Um diese Ätherschwefelsäuren des Skatols darzustellen, verarbeitete er den Harn nach dem gleichen Verfahren, welches Baumann und er⁷⁾ bei der Darstellung des Harnindicans benutzt hatten. Die dargestellten Kristalle reichten zur Analyse

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. X, S. 1027: Über die flüchtigen Bestandteile der menschlichen Exkremente.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XII, S. 1985: Über Skatol.

³⁾ Journ. f. prakt. Ch., N. F., Bd. XX, S. 446: Die empirische Formel des Skatols.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XII, S. 648: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fäulnisprodukte aus Eiweiß.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 371: Zur Kenntnis der Skatolbildung.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 414: Weitere Beiträge zur Kenntnis des Skatols.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 254: Über Indoxylschwefelsäure, das Indican des Harns.

nicht aus. In einem trockenen Reagensglas erhitzt, entwickelten sie rote Dämpfe. Der Rückstand gab mit BaCl_2 einen Niederschlag von BaSO_4 . Die wässrige Lösung der Kristalle, mit konzentrierter HCl versetzt, färbte sich rot und nach Zusatz von BaCl_2 fiel BaSO_4 heraus. Er bezeichnete also die fragliche Verbindung als Skatoxylschwefelsäure. Der durch Kochen mit HCl entstandene Skatolfarbstoff schied sich beim Erkalten als ein amorpher Niederschlag aus. Der Farbstoff ist unlöslich in Äther und Wasser, leicht löslich in Alkohol. Beim Eindampfen des Alkohols verwandelt er sich in einen braunen, in Wasser, Alkohol und Äther unlöslichen Farbstoff. Beim Erhitzen des roten oder braunen Farbstoffes entwickelt sich der Geruch nach Skatol. Analysen führten nicht zu einer einfachen Formel.

Otto¹⁾ ist der einzige Autor gewesen, der vielleicht die Skatoxylschwefelsäure aus Harn dargestellt hat. Aus dem an Skatolrotchromogen und Ätherschwefelsäuren reichen Harn eines Diabetespatienten erhielt er, nach Briegers Verfahren, eine Substanz, deren Gehalt an Stickstoff (eine Bestimmung) und an Schwefelsäure (zwei Bestimmungen) zu der Formel $\text{C}_9\text{H}_8\text{NOSO}_3\text{K}$ stimmte. Gewiß kein unstreitiger Beweis! Es gelang ihm nicht, aus diesem Harn die Skatolcarbonsäure darzustellen, dagegen ein braunes, vielleicht schon von Salkowski²⁾ und Brieger³⁾ bei Eiweißfäulnis erhaltenes Öl, welches sich mit rauchender Salpetersäure rot färbte und nach 14tägiger Fäulnis mit Kloaken-schlamm einen Geruch von Skatol entwickelte.

E. und H. Salkowski⁴⁾ haben vieles beigetragen zu der Kenntnis der Skatolderivate. Im Destillat von verschiedenen,

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. XXXIII, S. 607: Das Vorkommen großer Mengen von Indoxyl- und Skatolschwefelsäure im Harn bei Diabetes mellitus.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. II, S. 420: Zur Kenntnis der Pankreasverdauung.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 134: Über die aromatischen Produkte der Fäulnis aus Eiweiß.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 417: Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis, I.

Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 8: Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis, II.

Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIII, S. 189: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fäulnisprodukte aus Eiweiß.

in geschlossenen Kolben gefaulten Eiweißarten fanden sie immer Indol, Skatol und ein braunes Öl, welches sich mit reiner salpetrigsäurefreier Salpetersäure rot färbte. Ihre Untersuchungen führten zu den folgenden Resultaten:

1. Im Eiweißmolekül ist eine gemeinsame präformierte Muttersubstanz, welche je nach Umständen bald vorwiegend Indol, bald vorwiegend Skatol liefert und zwar so, daß das Skatol fast ganz fehlen kann. Die Indolgruppe ist in den verschiedenen Eiweißarten ungleich groß.

2. Die Menge des skatolhaltigen Indols ist größer, als von anderen Autoren angenommen wird. Die Ursache dieser Abweichung suchen sie darin, daß die anderen Autoren zur Fäulnis offene Gefäße verwendet haben, wodurch das gebildete Indol entweichen konnte.

3. Die Menge des gebildeten Indols (Skatols) nimmt mit der Dauer der Fäulnis zu. Andere Autoren hatten eine Abnahme konstatiert. Auch diese Abweichung läßt sich erklären durch Verdunstung aus den offenen Gefäßen und überdies hatten diese Autoren nicht untersucht, wieviel Eiweiß in Lösung gegangen war.

4. Die Menge des Indols (Skatols) nimmt in stärkerer Progression zu als die des in Lösung gegangenen Eiweißes: Das Indol (Skatol) wird nicht als solches aus dem Eiweiß frei, sondern durch Vermittlung einer Zwischenstufe.

Im Destillationsrückstand des Eiweißes fanden sie ein neues Skatolderivat: die Skatolcarbonsäure, eine einbasische, in kleinen bei 164° C. schmelzenden Täfelchen kristallisierende Säure, welche sich leicht in Alkohol und Äther und schwierig in Wasser löst. Über den Schmelzpunkt erhitzt, wird sie zerlegt in CO_2 und Skatol. Die wässrige Lösung färbt sich mit einigen Tropfen HNO_3 und 2—3 Tropfen 2%iger KNO_2 -Lösung rot. Dieser Farbstoff läßt sich durch Essigäther und Amylalkohol ausschütteln, aber nicht durch Äther und Chloroform. Die Lösung hat einen Absorptionsstreifen im Grün; Alkalien verwandeln die rote Farbe in eine braune. Denselben Farbstoff erhält man durch Zusatz von HCl und Chlorkalk oder von HCl und Eisenchlorid zu der wässrigen Lösung. Jedoch läßt sich der Farbstoff in diesen Fällen nicht durch Essigäther ausschütteln.

Die Menge der Skatolcarbonsäure nimmt mit der Dauer der Fäulnis zu. Ihre Alkalisalze sind sehr haltbar. Dennoch betrachten sie auch jetzt noch diese Säure als die Zwischenstufe zwischen Eiweiß und Skatol (Indol), wie sie schon früher gemeint haben.¹⁾

Bisweilen fanden sie statt der Skatolcarbonsäure eine andere bei 134° C. schmelzende Säure, welche E. Salkowski²⁾ erst später, veranlaßt durch Untersuchungen Nenckis, analysierte und als Skatolessigsäure feststellte.

Nach subkutaner Injektion der Skatolcarbonsäure fand E. Salkowski³⁾ nur einen kleinen Bruchteil im Harn.

Der Skatolgruppe des Eiweißes verdankt dieses die Reaktion von Adamkiewicz und die Xanthoproteinreaktion (E. Salkowski.⁴⁾

Nachdem es durch Fischers Synthese des Skatols aus Phenylhydrazinpropionaldehyd⁵⁾ leichter geworden war, eine größere Menge Skatol zu erhalten, hat Mester⁶⁾ versucht, das Schicksal des Skatols im Organismus zu prüfen: Hunde wurden mit Skatol gefüttert. Die Vermehrung der Ätherschwefelsäuren war sehr inkonstant und betrug höchstens $\frac{1}{5}$ des zugeführten Skatols. Es gelang ihm nicht, nach Briegers Verfahren Kristalle zu bekommen. Der Harn zeigte eine Linksdrehung von 1,5° bei 20 cm Rohrlänge und reduzierte alkalische Kupferlösung. Er meint denn auch, daß die Analogie mit Indol nicht so weit gehe, als allgemein angenommen wird. Vielleicht sei das Skatoxyl mit Glykuronsäure gepaart. Er hat jedoch nicht nachgewiesen, daß die linksdrehenden und reduzierenden Eigenschaften des Harns dem Skatolderivat zukamen. Kürzlich publizierte Unter-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIII, S. 2217: Über die skatolbildende Substanz.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 302: Über das Vorkommen von Skatolessigsäure bei Eiweißfäulnis.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 23: Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 215: Über die Farbenreaktionen des Eiweißes.

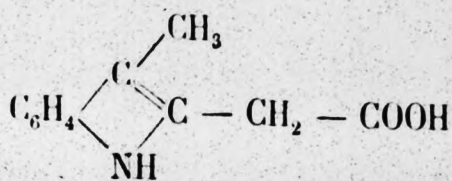
⁵⁾ Liebigs Ann., Bd. CCXXXVI, S. 137: Synthese von Indolderivaten.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 130: Über Skatoxylschwefelsäure und Skatolfarbstoff.

suchungen Grobers¹⁾ bestätigen diese Resultate: Nach Zuführung des Skatols (subkutan oder per os) trat zunächst eine Vermehrung der Ätherschwefelsäuren auf: später, nachdem der Organismus sich an das Skatol gewöhnt hatte, wurde die Menge der Ätherschwefelsäuren normal. Vielleicht scheidet sich das Skatol mit anderen Körpern aus (Glykuronsäure?).

Nencki²⁾ fand in den nicht flüchtigen Bestandteilen der Eiweißfäulnis durch anaerobe Spaltpilze ein neues Skatolderivat: Die Skatolessigsäure.

Die Skatolessigsäure



kristallisiert in Prismen oder sechsseitigen unregelmäßig gezackten Täfelchen, welche bei 134° C. schmelzen. Sie kann bis 200° C. ohne Zersetzung erhitzt werden. Beim Kochen zerlegt sie sich und gibt Skatolgeruch. Die wässrige Lösung gibt durch Zusatz von Fe₂Cl₆ eine weiße Trübung, welche beim Erwärmen vorübergehend rot wird. Aus einer wässrigen Lösung wird die Säure durch konzentrierte KNO₂-Lösung und Essigsäure fast quantitativ als Nitrososkatolelessigsäure niedergeschlagen.

Nencki war der Meinung, daß im Eiweißmolekül nebst zwei anderen aromatischen Gruppen (Tyrosin und Phenylamidopropionsäure) Skatolamidoessigsäure vorkommt, welche je nach Umständen (Temperatur, Luftzutritt, Bakterienart) Skatolelessigsäure, Skatolcarbonsäure, Skatol und Indol liefert. Diese Ansicht ist in schönster Weise von Cole und Hopkins³⁾ bestätigt worden.

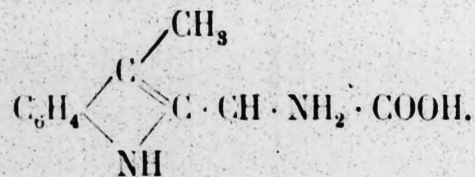
Aus den Produkten der Pankreasdigestion des Caseins gelang es ihnen, die Substanz darzustellen, welche von Neu-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 321: Über das Verhalten von zugeführtem Indol und Skatol im Organismus.

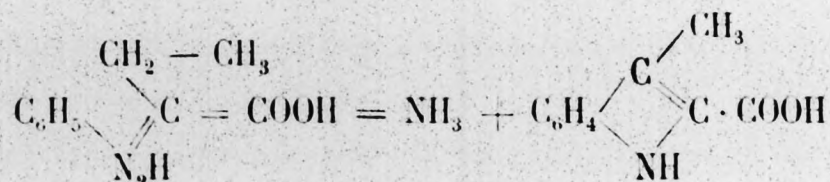
²⁾ Ber. d. k. Akad. d. Wiss. Math.-Nat.-Wiss. Cl., Bd. XCVIII, Abt. IIb, S. 347: Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweißes durch anaerobe Spaltpilze.

³⁾ Journal of Physiol., Bd. XXVII, S. 418: On proteid chemistry I. XXIX, 451: II.

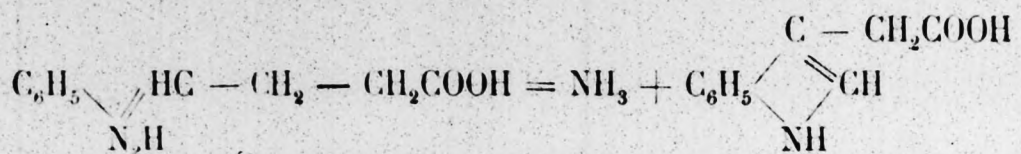
meister¹⁾ Tryptophan benannt war. Die Molekularformel des Tryptophans stimmte mit der Formel der bis jetzt hypothetischen Skatolamidoessigsäure: $C_{11}H_{12}N_2O_2$ überein. Durch Fäulnis mit anaeroben Bakterien lieferte es Skatolessigsäure, und durch Fäulnis mit aeroben Bakterien Skatolcarbonsäure, Skatol und Indol. Chemische Umsetzungen bestätigten die Identität des Tryptophans mit Skatolamidoessigsäure und sie gaben dieser Substanz, in Übereinstimmung mit Nenckis Formel der Skatol-essigsäure, folgende Strukturformel:



Dennoch scheint die Formel nicht richtig zu sein: Schon Wislicenus und Arnoldt²⁾ hatten aus Phenylhydrazinpropionylameisensäure die Skatolcarbonsäure dargestellt:



und die Säure war nicht identisch mit der «Fäulnis»-Skatolcarbonsäure Salkowskis. Darauf gelang es Ellinger, aus Phenylhydrazin- β -aldehydpropionsäure eine mit dieser «Fäulnis»-Skatolcarbonsäure identische Säure darzustellen:

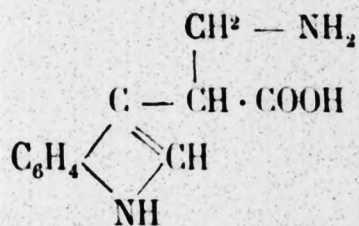


Diese Säure war die Indolessigsäure. Demnach mußte die Strukturformel des Tryptophans auch eine andere werden. Nun geht Hunden zugeführtes Tryptophan in den Harn als Kynurensäure über und liegt es also nahe, dem Tryptophan folgende Formel zuzuerkennen:

¹⁾ Zeitschr. f. Biol., N. F., Bd. VIII, S. 329, Fußnote: Über die Reaktionen der Albumosen und Peptone.

²⁾ Liebigs Ann., Bd. CCXLVI, S. 334: Über die Synthese von Ketonsäureestern.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1801: Über die Konstitution der Indolgruppe aus Eiweiß.



Die Meinung, daß das Chromogen des sogenannten Skatolrotes im Harn die Skatoxylschwefelsäure sei, stützt sich also hauptsächlich auf folgende Erwägungen:

1. Im Eiweißmolekül liefert ein gemeinsamer Atomkomplex sowohl das Indol als das Skatol.
2. Das Indol geht in den Harn als Indoxylschwefelsäure bzw. -glykuronsäure über.
3. Aus dem Harn ist ein Farbstoff darzustellen, der in Eigenschaften und Darstellungsweise Ähnlichkeit zeigt mit dem Farbstoff aus Skatolderivaten.
4. Einverleibung des Skatols hat eine Vermehrung des sogenannten Skatolrotes zufolge. (Nicht bewiesen!)
5. Einverleibung des Skatols verursacht eine (zwar nicht konstante) Vermehrung der Ätherschwefelsäuren, während aus diabetischem Harn die Skatoxylschwefelsäure dargestellt sein soll.

Daneben wurde Skatoxylglykuronsäure aus wenig stichhaltigen Gründen als Chromogen angenommen.

Stokvis,¹⁾ dem wir ein Verfahren verdanken, um das Chromogen des sogenannten Skatolrotes aus Menschenharn vom Indican zu trennen, konnte unter den Zersetzungsprodukten dieses Chromogens weder die Schwefelsäure, noch die Glykuronsäure nachweisen. Nach seiner Meinung sei es die Skatolessigsäure oder die Skatolcarbonsäure. Seine Annahme, daß das Chromogen aus Hämoglobin das Methämoglobin bilden könnte, ist von Steensma²⁾ widerlegt worden.

¹⁾ Ned. Tijdschr. v. Gen. 1901, Dl. I, p. 961. u. Hand. Ned. Nat. en Gen. Congr. 1901, p. 249: Over de scheidingsstof van het indigoblauw van die van het skatolrood in de urine van den mensch.

Ned. Tijdschr. v. Gen. 1903, Dl. II, p. 678: Over de casuïstiek der autotoxische enterogene cyanosen.

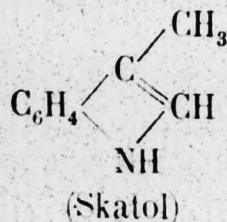
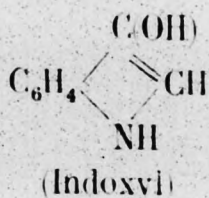
²⁾ Ned. Tijdschr. v. Gen. 1904, Dl. II, p. 425: Over het voorkomen van nitrieten in urine en hunne beteekenis voor het qual. en quant. urine-onderzoek.

Nun hat allerdings auch die ganze Hypothese Gegner gefunden:

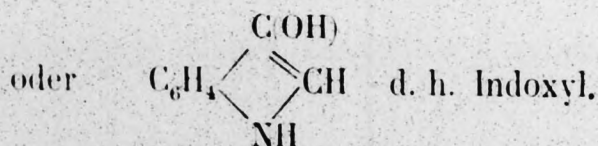
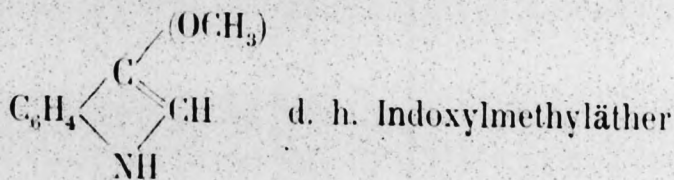
Rosin¹⁾ hob schon hervor, daß alle Meinungen über das Vorkommen des Skatolrotes unbewiesene Hypothesen seien. Er war nie einem derartigen Farbstoff begegnet und zählt denn auch alle derartigen Farbstoffe ohne weiteres zu dem Indigrot (obwohl sie unlöslich in Chloroform sind) oder zu den anderen *•bekanntem•* Harnfarbstoffen (zumal dem Urorosein).

So auch Maillard:²⁾ Alle derartigen Farbstoffe seien Indigrot (ungeachtet der Unlöslichkeit in Chloroform). Er führt jedoch andere beachtungswerte Argumente an:

1. Keiner habe je das Skatoxyl gesehen.
2. Ein dem Indoxyl analoges Skatoxyl sei unmöglich, denn an der Stelle, wo man das Hydroxyl finden müßte, ist schon die Methylgruppe anwesend:



Eine Oxydation an der betreffenden Stelle würde zu einem der folgenden Produkte führen:



Er hat denn auch die Überzeugung, daß das Skatol im Organismus die Methylgruppe verliere und als Indoxyl in den Harn übergehe. Er hat jedoch nicht nachgewiesen, daß nicht ein anderes Skatolderivat das Chromogen sein könnte.

Porcher und Hervieux³⁾ waren zunächst dieser Meinung

¹⁾ Virchows Arch., Bd. CXXIII, S. 591: Über Indigrot.

²⁾ L'indoxyle urinaire. Paris. Schleicher Frères & Cie., 1903.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 154: Über Harnindican.

zugetan. Später¹⁾ haben sie ganz ihre Meinung geändert, und nach Abschluß meiner Untersuchungen erschien noch eine Mitteilung,²⁾ in welcher sie ausführlicher berichteten, was zu dieser Meinungsänderung geführt hat:

Tieren, deren Harn infolge Milchdiät fast indicanfrei war, wurde per os Skatol zugeführt. Aus diesem Harn erhielten sie durch HCl (nur ausnahmsweise benützten sie ein Oxydationsmittel) den Skatolfarbstoff, der nach längerem Stehen zum Teil in Flocken herausfiel. Der Farbstoff ist unlöslich in Äther, Petroläther, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform: am besten löslich in Amylalkohol. Ein deutlich rot gefärbter Harn blaßt durch Zusatz von NaOH ab, aber nach erneutem Ansäuern kehrt die rote Farbe zurück. Vielleicht sei das Chromogen ein farbloses Salz, aus welchem durch HCl eine farbige Säure frei werde. Die amyalkoholische Lösung der Flocken blaßt durch NaOH nicht vollkommen ab. Reduktion entfärbt das Skatolrot: eine vorsichtige Oxydation ruft die rote Farbe zurück.

Nie konnten sie neben dem Skatolrot Indican nachweisen: Das Skatol geht also im Organismus nicht in Indoxyl über.

Spektroskopisch gibt eine gereinigte Farbstofflösung einen Streifen rechts³⁾ von der D-Linie des Natriums und eine Verdunkelung der rechten Seite des Spektrums. Eine nicht gereinigte Farbstofflösung gibt außerdem links vom ersten einen zweiten Streifen von wechselnder Helligkeit.

Sie identifizieren das Skatolrot mit dem Urorosein von Nencki und Sieber und auch mit den von anderen Autoren (Ploß, Golding Bird, Harley, Giacosa, Brieger, Mester, Otto, Grosser) gefundenen roten Farbstoffe. Allein diese letzten Farbstoffe sind stark verunreinigt.

Ohne Zweifel ist dieser Farbstoff auch identisch mit dem Farbstoff, dessen Chromogen ich aus normalem Harn erhalten

¹⁾ Comptes rend. de l'acad. des sciences à Paris, Bd. CXXXVIII, S. 1725: Couleurs urinaires après l'injection du scatol.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 486: Untersuchungen über Skatol.

³⁾ Das Wort «links» im Text ist natürlich ein Schreibfehler, wie aus der genauen Beschreibung des Streifens deutlich wird.

und in dieser Arbeit einer näheren Prüfung unterworfen habe. Kleine Abweichungen (z. B. Darstellung des Farbstoffs nur mittels Oxydation) beruhen wohl darauf, daß ich das Chromogen ohne oxydierende Beimengungen aus dem Harn erhalten konnte, während Porcher und Hervieux den Farbstoff direkt aus dem Harn darstellten. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Farbstoffchromogens und der Zuführung von Skatol darf nach diesen Untersuchungen wohl nicht mehr angezweifelt werden. Auf die Frage, ob der Farbstoff und sein Chromogen jedoch auch Skatolverbindungen seien, hofft diese Arbeit eine Antwort zu geben.

II.

Die Annahme, daß das Indigrot und das Skatolrot identisch seien, ist zu verwerfen, wegen der Unlöslichkeit des letzteren in Chloroform. Unbewiesen jedoch ist auch, daß das Chromogen dieses Farbstoffes Skatoxylschwefelsäure oder überhaupt ein Skatolderivat sei und ebenso daß es eine gepaarte Schwefelsäure oder Glykuronsäure sei. Wenn auch wirklich nachgewiesen wäre, daß nach Einverleibung des Skatols die Skatoxylschwefelsäure als Chromogen des betreffenden Farbstoffes im Harn aufgetreten wäre, dürfte diese Annahme nicht ohne weiteres auf normalen Harn bezogen werden, da es sich leicht denken läßt, daß derartige größere Mengen Skatol in abnormer Weise ausgeschieden werden.

Indessen kann man sich leicht überzeugen, daß in jedem normalen Harn nach Versetzen mit HCl und einem Oxydationsmittel (z. B. ein paar Tropfen sehr verdünnter KNO_2 -Lösung) nebst dem Indigrot ein Farbstoff gefunden wird, der sich durch die spektroskopischen Eigenschaften und die Unlöslichkeit in Chloroform vom Indigrot unterscheidet.

Der Zweck dieser Arbeit nun war, die Natur dieses Chromogens im normalen Harn näher zu untersuchen.

Dazu habe ich normalen Menschenharn verarbeitet nach dem oben erwähnten, von Stokvis angegebenen Verfahren: Der Harn wird gesättigt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und nachdem alle fällbaren Substanzen (Urobilin, Uroerythrin c. q. Gallenfarb-

stoff und Hämatophyrin) niedergeschlagen sind, filtriert. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade eingeeengt und nach dem Erkalten vom ausgeschiedenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abgegossen. Der Harn wird mit etwas Essigsäure angesäuert und im Scheidetrichter ausgeschüttelt mit Essigäther, in welchen die Chromogene des Indigrotes und des Skatolrotes übergehen. Der Essigäther wird durch Ausschütteln mit Wasser vom Indican befreit. Man setzt das Auswaschen so lange fort, bis das Wasser mit Isatinsalzsäure (Boumas Reagens¹) nicht mehr reagiert. Darauf wird dem Essigäther durch Ausschütteln mit KOH das Chromogen des Skatolrotes entzogen und die alkalische Lösung zum Aufbewahren mit Essigsäure neutralisiert.

Diese Lösung gibt mit Boumas Reagens keine Verfärbung; mit Obermeyers Reagens und anderen Oxydationsmitteln (HCl und Chlorkalk usw.) eine schöne Purpurfarbe. Ich habe als Oxydationsmittel immer HCl und 1 bis 2 Tropfen verdünnter KNO_2 -Lösung (0,2—0,5%) verwendet, da man diese Oxydation am besten dosieren kann und so der Gefahr vorbeugt, durch Überoxydation den Farbstoff nicht oder nur vorübergehend zu bekommen. Zersetzung der Lösung mit HCl allein gibt keine Verfärbung. Die Lösung hat zwei Absorptionsstreifen im Grün zwischen D und E. Der wässrigen Lösung wird der Farbstoff ganz durch Amylalkohol, teilweise durch Essigäther, gar nicht durch Äther und Chloroform entzogen. Alkalien färben die rote Lösung braun; durch Säuren kehrt die rote Farbe zurück.

Steensma²) versetzt den Harn statt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit Bleiessig. Wie man sich leicht überzeugen kann, wird in diesem Falle der Ertrag an Chromogen erheblich herabgesetzt. Auch enthält der Harn nach dem Ausschütteln noch immer Chromogen. Über die Ursache vergl. Kap. VI.

Es war unmöglich, das Chromogen aus dieser Lösung abzuscheiden. Beim Einengen entstand eine braune, sirupartige, mit Kaliumacetat verunreinigte Masse, aus welcher das essig-

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

²) Ned. Tijdschr. v. Gen. 1904, Dl. II, p. 425: Over het voorkomen van nitrieten in urine en hunne beteekenis voor het qual. en quant. urine onderzoek.

saure Kalium nicht zu entfernen war, da seine Löslichkeitsverhältnisse sich denen des Chromogens ähnlich zeigten.

Ebensowenig gelang es, das Chromogen aus dieser Lösung in einer Form niederzuschlagen, welche weitere Untersuchung zuließ. Bleizucker und Bleiessig fällten es nur teilweise; Silbernitrat gab einen gelben, sich bald schwärzenden (auch im Dunkeln) Niederschlag. Der amorphe gelbe Niederschlag mit essigsauerm oder salpetersauerm Quecksilber setzte, wenn er in wässriger Suspension mit H_2S zersetzt wurde. Essigsäure oder Salpetersäure in Freiheit; im letzteren Falle auch etwas HNO_2 ; die Lösung färbte sich rot.

Dagegen gelang es mir, aus dem von Indican befreiten Essigäther ein Mg-haltiges Präparat des Chromogens darzustellen, welches weitere Untersuchungen zuließ. Auch mit $BaCO_3$, $CaCO_3$, $SrCO_3$, $ZnCO_3$ und $Cu(OH)_2$ habe ich versucht derartige Präparate darzustellen, aber diese waren entweder fast unlöslich (steinhart), sodaß man sie nicht verarbeiten konnte (z. B. die Ba- und Ca-haltigen Präparate) oder sie zeigten sich bei der Verarbeitung nicht haltbar (die Zn- und Cu-haltigen Präparate).

Das «Mg-Präparat» erhielt ich in folgender Weise:

Man läßt den von Indican befreiten Essigäther, vermischt mit $MgCO_3$, während 24 Stunden in einem Kolben stehen. Dann und wann wird der Kolben umgeschüttelt. Darauf gießt man den Inhalt in eine Schale und läßt den Essigäther verdunsten. Der Rückstand wird extrahiert mit 90%igem Alkohol, in welchen das Chromogen übergeht. Nach dem Abfiltrieren der alkoholischen Lösung vom Unlöslichen ($MgCO_3$) wird die Lösung zum Trocknen verdunstet, der Rückstand abermals in 90%igem Alkohol aufgenommen, die Lösung filtriert und wieder zum Trocknen verdunstet.

Das Mg-Präparat ist ein braungelbes amorphes Pulver, löslich in Wasser, Alkohol, Alkalien und mineralischen Säuren, unlöslich in Äther, Chloroform, Aceton. Beim Verbrennen hinterläßt es eine weiße Asche ($MgCO_3$ oder MgO) und beim Sublimieren, welches, wie das Verbrennen, mit üblem Geruch verbunden ist, bleibt auch etwas Kohle zurück. Die neutralen, sauren oder alkalischen Lösungen zeigen keine Absorptionsstreifen.

Beim Versetzen der Lösung mit HCl und 1—2 Tropfen 0,5%iger KNO_2 -Lösung färbt sie sich, zumal beim Erwärmen, schön rot. Ohne Zusatz von KNO_2 tritt keine Rotfärbung auf. Der Farbstoff entsteht also durch Oxydation und nicht etwa durch Freimachen einer rotgefärbten Säure. Der wässrigen Lösung kann der Farbstoff durch Amylalkohol und teilweise durch Essigäther entzogen werden; dagegen gar nicht durch Äther oder Chloroform. Durch Neutralisieren der sauren Lösung verwandelt sich die rote Farbe in eine braune; Zusatz von Säuren ruft die rote Farbe wieder zurück. Durch Zn wird die saure Lösung entfärbt; Oxydation färbt sie wieder rot. Nie habe ich beim Erhitzen des Farbstoffes mit Zinkstaub den Geruch nach Skatol (Indol) wahrgenommen. Die Farbstofflösung gibt zwei Absorptionsstreifen: einen im Anfang und einen schwächeren am Ende des Grüns; auch ist der violette Teil des Spektrums teilweise absorbiert.

Aus einer konzentrierten Lösung des Mg-Präparates fällt, nach Zusatz von HCl und KNO_2 , ein Teil des Farbstoffes heraus. Dieser rote, in Alkohol und Aceton lösliche Niederschlag verwandelt sich bald in einen braunen, in Alkohol und Aceton unlöslichen Farbstoff, der nur durch starke Mineralsäuren wieder gelöst werden kann. Diese Lösung gibt keine Absorptionsstreifen, im Gegensatz zu der alkoholischen Lösung des frischen Niederschlages, welche dieselben spektroskopischen Eigenschaften hat wie die Lösung, aus welcher der Farbstoff sich ausgeschieden hat.

Dieses Mg-Präparat liefert also das sogenannte Skatolrot.

III.

Analysen dieses Präparates ergaben eine konstante Zusammensetzung. Es enthält Mg, C, H, N und O, aber keinen Schwefel.

Zur Analyse verwendete ich 5 Präparate von je 1 g ungefähr. Zu 1 g Präparat sind 30—35 Liter Harn erforderlich. Außer den 5 mit A, B, C, D und E benannten Präparaten stellte ich noch ein Präparat F (von ca. 2,5 g) dar, zu vergleichenden N-Bestimmungen nach Dumas und Kjeldahl und

noch 4 Präparate zu Bestimmungen des Schwefels (bezw. der gepaarten Schwefelsäure).

I. Bestimmung des Mg (als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$).¹⁾

Präparat A:

0,2472 g Substanz gaben 0,1219 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,02636$ g Mg oder 10,66 %.

Präparat B:

Beim Wägen des $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ist etwas verloren gegangen.

Präparat C:

0,1905 g Substanz gaben 0,0882 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,01907$ g Mg oder 10,01 %.

Präparat D:

0,1947 g Substanz gaben 0,0911 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0197$ g Mg oder 10,12 %.

Präparat E:

0,2447 g Substanz gaben 0,1160 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0251$ g Mg oder 10,25 %.

II. Bestimmung des C und H.

Präparat A:

0,3283 g Substanz gaben 0,5613 g $\text{CO}_2 = 0,15308$ g C oder 46,63 % und
0,1504 g $\text{H}_2\text{O} = 0,01671$ g H oder 5,09 %.

Präparat B:

0,2722 g Substanz gaben 0,4651 g $\text{CO}_2 = 0,12685$ g C oder 46,60 % und
0,1233 g $\text{H}_2\text{O} = 0,0137$ g H oder 5,03 %.

Präparat C:

0,2662 g Substanz gaben 0,4542 g $\text{CO}_2 = 0,1238$ g C oder 46,53 % und
0,1154 g $\text{H}_2\text{O} = 0,01282$ g H oder 4,82 %.

Präparat D:

0,2148 g Substanz gaben 0,3661 g $\text{CO}_2 = 0,09985$ g C oder 46,48 % und
0,0951 g $\text{H}_2\text{O} = 0,01056$ g H oder 4,92 %.

Präparat E:

0,2184 g Substanz gaben 0,3740 g $\text{CO}_2 = 0,1020$ g C oder 46,70 % und
0,0995 g $\text{H}_2\text{O} = 0,01105$ g H oder 5,06 %.

III. Bestimmung des N.

Präparat A wurde nach Kjeldahl bestimmt. Dabei ergab sich jedoch, daß nach dem Zerstören kein farbloses Produkt zurückblieb. Deshalb habe ich darauf von Präparat F einige vergleichende Bestimmungen nach Dumas und Kjeldahl ausgeführt. Die Kjeldahl-Bestimmungen geben, ohne nachweisbare Ursache, derartig von einander und von den Dumas-

¹⁾ Zu jeder Bestimmung ist zuvor die Substanz bei 100 bis 105° C. getrocknet.

Bestimmungen desselben Präparates abweichende Daten, daß sie weiter außer acht gelassen worden sind.

Präparat F (nach Dumas):

0,306 g Substanz gaben 10 ccm N (T. = 18,3° C., Ba = 764 mm) =
11,595 mg N oder 3,79 %.

0,2071 g Substanz gaben 6 ccm N (T. = 23,3° C., Ba = 756 mm) =
6,7152 mg N oder 3,26 %.

0,2233 g Substanz gaben 6,75 ccm N (T. = 21,4° C., Ba = 759 mm) =
7,6747 mg N oder 3,44 %.

0,3147 g Substanz gaben 9,5 ccm N (T. = 21,4° C., Ba = 765 mm) =
10,865 mg N oder 3,45 %.

Präparat F (nach Kjeldahl):

0,3724 g Substanz gaben (9,35 ccm $\frac{n}{4}$ -H₂SO₄) = 32,725 mg N oder 8,78 %.

0,2386 „ „ „ (4,15 „ $\frac{n}{4}$ -H₂SO₄) = 14,525 „ „ „ 6,09 %.

0,1773 „ „ „ (1,65 „ $\frac{n}{4}$ -H₂SO₄) = 5,775 „ „ „ 3,26 %.

0,1884 „ „ „ (1,55 „ $\frac{n}{4}$ -H₂SO₄) = 5,425 „ „ „ 2,88 %.

Präparat A (nach Kjeldahl):

0,2799 g Substanz gaben (2,25 ccm $\frac{n}{4}$ -H₂SO₄) = 7,875 mg N oder 2,81 %.

Nach Dumas:

Präparat B:

0,3647 g Substanz gaben 10,25 ccm N (T. = 18,8° C., Ba = 768 mm) =
11,9225 mg N oder 3,269 %.

Präparat C:

0,4287 g Substanz gaben 12,5 ccm N (T. = 23,2° C., Ba = 766 mm) =
14,187 mg N oder 3,31 %.

Präparat D:

0,3716 g Substanz gaben 10,5 ccm N (T. = 22,6° C., Ba = 769 mm) =
12,0069 mg N oder 3,23 %.

Präparat E:

0,3592 g Substanz gaben 9,5 ccm N (T. = 23° C., Ba = 769 mm) =
10,8345 mg N oder 3,016 %.

IV. Bestimmung des S.

a) Ätherschwefelsäure. Zur Bestimmung eventueller Ätherschwefelsäure wurde die Substanz während einer Stunde auf dem gut kochenden Wasserbade mit 1% HCl erhitzt (Baumann¹) Salkowski²) und in dieser Flüssigkeit die Schwefelsäure als BaSO₄ bestimmt:

¹) Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 70: Über die Bestimmung der Schwefelsäure im Harn.

²) Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 346: Über die quantitative Bestimmung der Schwefelsäure und Ätherschwefelsäure im Harn.

schlag von symmetrischem Trinitrobenzol-Skatol in bei 183° C. schmelzenden, roten nadelförmigen Kristallen (v. Romburgh).¹⁾ Die Prüfung des Destillats ergab kein Skatol.

Mit Phenylhydrazin und Eisessig entstand ein in Wasser unlöslicher Niederschlag.

Folgender Versuch gab etwas Licht über die Zusammensetzung des Präparates:

2,1026 g Mg-Präparat wurde mit ca. 20 ccm Normal-H₂SO₄ versetzt (also etwas mehr als erforderlich, um das Mg aus seiner Verbindung auszutreiben) und die Lösung so lange abdestilliert, bis keine Säure mehr überging. Das Destillat wurde neutralisiert (mit 134,4 ccm 0,0971 Normal-NaOH) und ca. 2,5 g AgNO₃ hinzugefügt. Der entstandene weiße Niederschlag wurde durch Erwärmen gelöst, wobei sich jedoch ein schwarzer Niederschlag bildete. Die Lösung wurde heiß filtriert und aus dem Filtrat schieden sich beim Erkalten weiße Kristalle aus, deren Silbergehalt durch Glühen und Wägen bestimmt wurde:

- | | | |
|---------------------------|-----------------|--------|
| a) 39,8 mg Substanz gaben | 25,6 mg Ag oder | 64,32% |
| b) 96,3 | 62,3 | 64,69% |

Silberacetat enthält 64,67% Ag. Die Kristalle sind also Silberacetat.

Der oben erwähnte schwarze Niederschlag und die Mutterlauge wurden durch HCl entsilbert. Die vom Silberchlorid abfiltrierten Flüssigkeiten ließen nach Verdunstung nichts zurück. Das Destillat enthielt also außer einer geringen Verunreinigung (s. u.) nur Essigsäure und zwar: 782,38 mg (= 134,4 ccm 0,0971 Normal-NaOH) oder 37,21% (des Mg-Präparates).

Auffallend war der geringe Ertrag an Silberacetatkristallen aus diesem Destillat. Jedenfalls erhielt ich aus 0,5 g reiner Essigsäure eine erheblich größere Quantität. Wenn man jedoch diese Kristalle durch Erwärmen wieder in ihrer Mutterlauge löste und diese Lösung mit 2 Tropfen des zehnmal verdünnten braunen Destillationsrückstands versetzte, entstand gleichfalls ein schwarzer Niederschlag und war der Ertrag an Silberacetat-

¹⁾ Rec. du trav. chim. des Pays-Bas et de la Belgique, Bd. XIV, S. 65: Sur quelques combinaisons du trinitrobenzène sym.

kristallen bedeutend herabgesetzt. Bei der Destillation scheinen also Spuren dieses Rückstandes mit den Wasserdämpfen übergeführt zu werden.

Der braune Destillationsrückstand blieb einige Tage im Exsikkator stehen. Nach dieser Zeit hatten sich braun gefärbte Kristalle abgesetzt, welche durch Abspülen mit Alkohol oder Aceton und Umkristallisieren aus Wasser farblose, bei 187°C . schmelzende Kristalle lieferten, die sich schwierig in kaltem Wasser und leicht in heißem Wasser und Alkohol zu einer stark sauren Flüssigkeit lösten.

Diese Kristalle erwiesen sich, nach dem Zusammenschmelzen mit Na, Lösung dieser Schmelze in Wasser und Bildung von Berlinerblau auf Zusatz von FeSO_4 und HCl zu dieser wässrigen Lösung, als stickstoffhaltig.

Ein Gemenge von Hippursäure (Schmelzpunkt 187°C .) und von diesen Kristallen hatte ebenfalls einen Schmelzpunkt 187°C .; dagegen ein Gemenge von Paramidobenzoessäure (Schmelzpunkt 186°C .) und von diesen Kristallen einen Schmelzpunkt 150°C . unter gleichzeitiger Zersetzung (Gasentwicklung).

Die gefundene Säure war also Hippursäure. Diese Annahme wurde bestätigt durch:

a) eine N-Bestimmung:

0,1983 g Substanz gaben 13,6 ccm N (T. = 6°C ., Ba = 748 mm)

15,947 mg N oder 8,04 %.

Hippursäure enthält 7,82 % N.

b) eine Aciditätsbestimmung:

41,9 mg Substanz wurden neutralisiert durch 2,4 ccm 0,0971 Normal-NaOH (= 41,71 mg Hippursäure).

Das Mg-Präparat enthält also neben dem Chromogen noch Essigsäure und Hippursäure.

Es lag nahe, zu untersuchen, ob das Chromogen aus dem von Indican befreiten Essigäther nicht ohne die oben erwähnten Säuren darzustellen war. Der Essigäther wurde zum größten Teil abdestilliert und der Rückstand, nach dem Erkalten, von der ausgeschiedenen Hippursäure abgegossen. Beim weiteren Verdunsten des Essigäthers setzten sich allmählich noch Hippursäurekristalle ab, und durch wiederholtes Auflösen in kaltem Essigäther gelang es, ein fast ganz hippursäurefreies Präparat

darzustellen. In dieser Weise erhielt ich eine braune sirupartige Masse, welche sogar nach wochenlangem Verbleiben im Exsikator flüssig blieb.

Ich habe dieses Präparat noch einmal auf gepaarte Schwefelsäure geprüft. Dazu wurde das Chromogen aus 30–35 l Harn in heißem Wasser gelöst und mit heißer BaCl_2 -Lösung versetzt. Diese klare Lösung wurde zur völligen Sicherheit heiß filtriert (beim Erkalten scheidet sich die braune Masse aus) und das Filtrat eine Stunde mit HCl (bis 1%) erhitzt. Diese Lösung wurde durch ein aschefreies Filter filtriert und das Filter in einem Platintiegel verbrannt. Die Asche wurde mit K_2CO_3 im Gebläse zusammenschmolzen, die Schmelze mit Wasser ausgezogen und die wässrige Lösung mit BaCl_2 und etwas HCl versetzt. Es entstand eine minimale (jedoch unwägbare) Trübung. Ein Kontrollversuch mit einem gleichartigen Filter, wie es zu diesem Versuch gedient hatte, gab dieselbe Trübung.

Das Chromogen ist also keine gepaarte Schwefelsäure (vergl. auch Kap. III).

Eine Lösung dieses Chromogens wurde eine Stunde mit HCl (bis 1%) gekocht: die Lösung reduzierte Fehlings Lösung nicht. Das Chromogen ist also auch keine gepaarte Glykuronsäure.

Darauf habe ich untersucht, ob aus diesem Chromogen in einfacher Weise Skatol (oder Indol) darzustellen wäre. Dazu verwendete ich das braune Filtrat, welches ich bei der Untersuchung auf Schwefelsäure nach dem Zusatz von BaCl_2 erhalten hatte. Es gab mit HCl und KNO_2 noch eine schöne Farbenreaktion.

Dieses Filtrat wurde in zwei Hälften geteilt: die eine Hälfte wurde nach Zusatz von NaOH und Zinkstaub, die andere Hälfte nach Zusatz von H_2SO_4 und Zinkstaub der Destillation unterworfen. Nach Ablauf der Destillation färbten sich beide Rückstände durch HCl und KNO_2 noch schön rot.

Beide Destillate und beide Rückstände wurden mit Äther ausgeschüttelt, von den ätherischen Lösungen der Äther abdestilliert und die minimalen Rückstände in Alkohol aufgenommen. Keine dieser alkoholischen Lösungen gab, mit alkoholischer Trinitro-

benzollösung versetzt, auch nur eine Spur der roten Kristalle (auch nicht nach dem Verdunsten des Alkohols).

Destillation des Chromogens mit NaOH oder H_2SO_4 (ohne gleichzeitige Reduktion) gab ebenfalls negative Resultate.

Darauf habe ich versucht, ob bei Zersetzung durch Bakterien Skatol oder Indol auftreten würde.

Um die geeigneten Bakterien zu züchten, habe ich eine Gelatinekultur (Gelatine mit auf $1/10$ Volumen eingengtem Leitungswasser und $1/10$ 0/0 K_2HPO_4) geimpft mit Gartenerde¹⁾ und diese Kultur bei $40^\circ C.$ im Brutofen sich entwickeln lassen. Mit den gezüchteten Bakterien wurden drei Kulturen gemacht:

- a) eine neue Gelatinekultur als Kontrollkultur:
- b) eine Peptonkultur: Die Kultur enthielt Pepton statt Gelatine. Nach 2–3 Tagen konnte man in dieser Kultur eine schöne Nitroso-Indolreaktion hervorrufen;
- c) eine Gelatinekultur, zu welcher das Chromogen zugesetzt war. (Leicht alkalische Reaktion.)

Nach 6–8 Tagen gibt die dritte Kultur mit HCl und KNO_2 keine Verfärbung mehr. Sie gibt ebensowenig die Reaktion mit Glyoxylsäure (Adamkiewicz).

Diese dritte Kultur wurde bei alkalischer Reaktion abdestilliert: Weder im Destillat, noch im Rückstand konnte in der bekannten Weise auch nur eine Spur Skatol (Indol) nachgewiesen werden.

In einer Kultur, welche nur Chromogen und Nährsalze enthielt, starben die Bakterien ab.

Also gab das Chromogen weder durch Sublimation noch durch Reduktion und Destillation, noch durch bakterielle Zersetzung auch nur eine Spur Skatol oder Indol. Dagegen bildet sich aus den bekannten Skatolderivaten (von welchen nur die Skatolcarbonsäure mit HCl und KNO_2 einen haltbaren roten Farbstoff liefert) sehr leicht Skatol. (Die Skatolcarbonsäure gibt schon beim Erhitzen über den Schmelzpunkt Skatol ab.) Ich schließe demnach: Das Chromogen des sogenannten

¹⁾ Diese Kultur wurde von Prof. Beyerinck in Deift empfohlen. Das Einengen des Leitungswassers ist erforderlich wegen der minimalen Quantität Salze im hiesigen Leitungswasser.

Skatolrotes im normalen Harn ist kein Skatolderivat im chemischen Sinn, wenn auch aus den von Porcher und Hervieux mitgeteilten Befunden hervorgeht, daß das Auftreten dieses Chromogens durch Resorption von Skatol aus dem Darm hervorgerufen wird.

Wohl ist mir die große Ähnlichkeit zwischen dem sogenannten Skatolrot und dem Urorosein von Nencki und Sieber¹⁾ aufgefallen.

Bekanntlich stellten Nencki und Sieber das Urorosein dar durch Versetzen des Harns mit HCl. Wenn sie auch kein Oxydationsmittel gebrauchten, konnten sie doch die Mitwirkung der oxydierenden Substanzen aus dem Harn nicht ausschließen. Auch das sogenannte Skatolrot ist aus den meisten Harnen durch HCl allein zu erhalten.

Das Urorosein hat die folgenden Eigenschaften:

1. Der Farbstoff löst sich mit roter Farbe in Wasser, Äthyl- und Amylalkohol. Äther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff entziehen der wässrigen Lösung den Farbstoff nicht.
2. Die alkoholische Lösung hat einen Absorptionsstreifen im Anfang des Grüns zwischen D und E, während der violette Teil des Spektrums teilweise absorbiert ist.

Nencki und Sieber haben auch einen zweiten Streifen wahrgenommen, welchen sie jedoch einer Spur Urobilin zuschreiben.

3. Alkalien verwandeln den roten Farbstoff in einen braunen. Durch Zusatz von Säuren kehrt die rote Farbe zurück. Zinkstaub entfärbt die saure Lösung des Farbstoffes; durch Oxydation wird die Farbe wieder rot.

4. Die Lösung färbt Wolle. Durch Natriumacetat im Überschuß wird der Farbstoff fixiert und nur durch Kochen mit H₂SO₄-haltigem Alkohol kann der Farbstoff wieder gelöst werden.

Auch das sogenannte Skatolrot hat, wie ein besonders darauf gerichteter Versuch mich lehrte, dieselbe Eigenschaft.

Nun geben jedoch Nencki und Sieber an, daß das Urorosein sehr unbeständig ist. Dagegen ist das sogenannte Skatolrot in nicht verunreinigter Lösung sehr beständig. Ich

¹⁾ Journ. f. prakt. Ch., N. F., Bd. XXVI, S. 333: Über das Urorosein.

habe eine saure Lösung des sogenannten Skatolrotes mehr als $1\frac{1}{2}$ Jahre aufbewahrt, ohne daß die Farbe verblaßte.

Wenn man jedoch normalen Harn mit einer dunkelroten Lösung des sogenannten Skatolrotes versetzt, dann ist ungefähr $\frac{1}{5}$ Volumen erforderlich, bevor der Harn sich rosa färbt. Wahrscheinlich verdeckt die gelbe Harnfarbe die rote. Auch verblaßt in diesem Falle nach einigen Stunden die Farbe. Wahrscheinlich sind hieran die Eigenschaften des Harns schuld. Und hiermit ist auch wohl in Übereinstimmung, daß Nencki und Sieber das Urorosein nur aus pathologischem Harn erhalten konnten. Ein größerer Gehalt des pathologischen Harns an Nitriten gab vielleicht Gelegenheit, genug Farbstoff zu bilden, um die rote Farbe trotz der gelben Harnfarbe sichtbar zu machen.

Übrigens stimmt die Darstellung überein mit der Darstellung des sogenannten Skatolfarbstoffes. Auch Brieger, Mester und Otto erhielten ihren Skatolfarbstoff durch Kochen mit HCl. Und weil nun sowohl die bekannten Skatolderivate als das von mir untersuchte Chromogen nur durch Oxydation einen roten Farbstoff bilden, ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch Nencki und Sieber zu der Darstellung des Uroroseins, ohne darauf zu achten, die oxydierenden Substanzen des Harns benutzt haben.

Die Ähnlichkeit zwischen dem Urorosein und dem sogenannten Skatolrot läßt auf ihre Identität schließen. Und wenn nun auch vorläufig der Name Urorosein keine Auskunft über die Zusammensetzung gibt, so wird doch durch diese Identität die Zahl der Harnfarbstoffe um einen vermindert.

Dennoch bleibt es möglich, daß im Harn Skatolderivate vorkommen. Allein sie sind im normalen Menschenharn nicht das Chromogen des sogenannten Skatolrotes. Der Name Skatolrot darf gewiß nicht buchstäblich aufgefaßt werden, wenn man den so benannten Farbstoff aus normalem Harn meint. Der von Salkowski u. a. aus Skatolcarbonsäure dargestellte Farbstoff führt natürlich mit vollem Rechte diesen Namen.

V.

Weil es vielleicht möglich wäre, auf indirektem Wege näheres über die Zusammensetzung des Chromogens zu finden, habe ich im Mg-Präparat die Säuren quantitativ bestimmt.

1. In der in Kapitel IV angegebenen Weise wurde aus 1,0139 g Mg-Präparat die Essigsäure abdestilliert. Das Destillat wurde neutralisiert durch 67,4 ccm 0,95 Normal-NaOH, enthielt also 384,18 mg Essigsäure oder 37,89%.

Im neutralisierten Rückstand wurde die Hippursäure durch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ niedergeschlagen: dieser Niederschlag in H_2SO_4 (mit gleichem Volumen Wasser verdünnt) gelöst und diese Lösung 15 Stunden am Rückflußkühler gekocht, um die Hippursäure zu zerlegen in Benzoesäure und Glycocoll,¹⁾ in der Absicht, die gebildete Benzoesäure mit Äther auszuschütteln und zu bestimmen. Zu meiner Überraschung enthielt der Äther nur Spuren Benzoesäure. Ein gleichzeitiger Kontrollversuch mit 0,4098 reiner Hippursäure lieferte in ähnlicher Weise ebenfalls nur Spuren Benzoesäure.

2. Ich habe darauf versucht, die Zerlegung in einer von Beilstein²⁾ angegebenen Weise zu bewerkstelligen und zwar zunächst aus reiner Hippursäure (als Kontrollversuch): Die Hippursäure wurde $\frac{1}{4}$ Stunde mit rauchender Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Beim Erkalten schieden sich Benzoesäurekristalle aus. Das Gemenge von HCl und Benzoesäure wurde mit Äther ausgeschüttelt (dabei blieben noch unzerlegte Hippursäurekristalle in der Salzsäure zurück). Der Äther wurde in einem kurzhalsigen, mit weiter Öffnung versehenen Kolben abdestilliert und beim Auskristallisieren der Benzoesäure wurde darauf geachtet, daß sie sich in dünner Schicht über die Innenfläche des Kolbens absetzte. Der Kolben blieb 2 Tage bei 25—30° stehen, um Spuren in den Äther übergangener Salzsäure verdunsten zu lassen. Die Benzoesäure wurde darauf titriert. Eine Schmelzpunktbestimmung (120° C.) lieferte den Beweis, daß die Säure wirklich Benzoesäure war. Die aus

¹⁾ Schmidt, Handb. der pharm. Ch., Bd. II, 1, S. 354.

²⁾ Handb. der org. Ch., Bd. II, S. 1136.

0,4404 g Hippursäure in dieser Weise dargestellte Benzoesäure wurde neutralisiert durch 10 ccm 0,2128 Normal-NaOH = 259,62 mg Benzoesäure oder 86,49% der berechneten Quantität.

Bei zwei folgenden Bestimmungen aus reiner Hippursäure wurde $\frac{3}{4}$ Stunde gekocht statt $\frac{1}{4}$ Stunde. Es blieben in diesem Fall keine unzerlegten Hippursäurekristalle zurück:

0,4129 g Hippursäure gaben 264,806 mg Benzoesäure (= 10,2 ccm 0,2128 Normal-NaOH) oder 94,11% der berechneten Quantität.

0,4167 g Hippursäure gaben 270 mg Benzoesäure (= 10,4 ccm 0,2128 Normal-NaOH) oder 95,65% der berechneten Quantität.

Im Durchschnitt also: 94,58%.

3. In dieser Weise erhielt ich aus 1,0518 g Mg-Präparat: 218,075 mg Benzoesäure (= 8,4 ccm 0,2128 Normal-NaOH) = 319,96 mg Hippursäure oder 30,42% (des Mg-Präparates).

4. In 0,6702 g Mg-Präparat wurde zunächst die Essigsäure bestimmt: 252,806 mg Essigsäure (= 19,8 ccm 0,2128 Normal-NaOH) oder 37,72%. Der neutralisierte Rückstand wurde eingeeengt und darauf mit HCl gekocht usw. Er gab: 137,59 mg Benzoesäure (= 5,3 ccm 0,2128 Normal-NaOH) = 201,88 mg Hippursäure oder 30,12%.

Es wurde also gefunden:

an Essigsäure	an Hippursäure
37,21% (vergl. Kap. IV)	—
37,89%	—
—	30,42%
37,72%	30,12%

Durchschnittlich: Essigsäure 37,61%

Hippursäure 30,27% (korr. 32,004%).

Demnach enthält 1 g Mg-Präparat: 376,1 mg Essigsäure und mindestens 302,7 mg Hippursäure, welche bezw. 75,22 mg und 21,455 mg Mg binden zu 445,05 mg Magnesiumacetat und 339,71 mg Magnesiumhippurat. Nun enthält 1 g Mg-Präparat 102,6 mg Mg (vergl. Kap. III); es ist also 5,93 mg Mg weniger gebunden, als das Präparat enthält. Hierbei ist zu bemerken, daß der Gehalt an Hippursäure ohne Zweifel größer sein muß, denn der Kontrollversuch lehrt, daß nur 94,58% zurückgefunden werden. Diese Differenz liegt also ohne Zweifel innerhalb der

Versuchsfehlergrenze und läßt nicht schließen, daß auch das Chromogen noch Magnesium gebunden hätte.

Auch über den Stickstoffgehalt des Chromogens geben diese Bestimmungen keine Auskunft. In 1 g Mg-Präparat ist 33,46 mg N (vergl. Kap. III), die Hippursäure des Präparates enthält mindestens 25,032 mg N, also könnte höchstens 8,43 mg N eine andere Herkunft haben. Wenn man sich jedoch die ganze disponible Quantität Mg (5,93 mg) an Hippursäure gebunden denkt (= 6,92 mg N), bleibt nur 1,51 mg N übrig.

Die bei dieser Analyse erhaltenen Resultate lassen sogar über die qualitative Zusammensetzung des Chromogens nichts schließen.

Immerhin bleibt die konstante Zusammensetzung des Mg-Präparates auffallend. Es ist immer nur in toto löslich, bezw. unlöslich und nie ist es mir gelungen, durch Lösungsmittel das Präparat in seine Bestandteile zu zerlegen.

VI.

Zum Schluß noch einiges über das Verfahren nach Stokvis. Ein einziges Mal habe ich, um bald über eine größere Quantität Chromogen verfügen zu können, Pferdeharn verwendet. Statt mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ habe ich den Harn mit Bleiessig versetzt, weil der Pferdeharn sich mit Bleiessig bequemer verarbeiten läßt. Am Ende erhielt ich jedoch aus dem Essigäther nur eine kleine Quantität Chromogen und auch nur spärliche Hippursäurekristalle, weil diese Säure zum größten Teil als Bleisalz niedergeschlagen war, während der ausgeschüttelte Harn mit HCl und KNO_2 noch sehr viel sogenanntes Skatolrot lieferte.

Beim Versetzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dagegen konnte ich den Pferdeharn ganz vom Chromogen befreien, und der Essigäther enthielt eine bedeutende Quantität Chromogen und Hippursäure.

Weil nun die Hippursäure, wie andere Versuche mich lehrten, nur schwierig vom Chromogen zu reinigen ist, ist es nicht unwahrscheinlich, daß das Verfahren nach Stokvis auf der Eigenschaft der Hippursäure beruht, Farbstoffe mitzureißen.

Vielleicht erleichtert die Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ den Übergang des Chromogens in den Essigäther.

Es wird nun auch ersichtlich, weshalb bei der Verarbeitung des Harns nach Steensma der Ertrag an Chromogen so erheblich niedriger ist als bei dem Verfahren nach Stokvis (vergl. Kap. II).

Schlußfolgerungen.

1. Das Chromogen des sogenannten Skatolrotes im normalen Menschenharn ist keine gepaarte Schwefelsäure (bezw. Glykuronsäure).

2. Dieses Chromogen ist kein Skatolderivat (im chemischen Sinne des Wortes).

3. Das sogenannte Skatolrot ist identisch mit dem Uro-rosein von Nencki und Sieber.
