

# Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffs des Harns.

Von

**St. Dombrowski.**

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften in Krakau.)

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów [Lemberg].)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Dezember 1907.)

## A. Historisches.

Von den Eigenschaften des Harns fällt zunächst seine eigentümliche Farbe auf. Die Harnfarbe ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen; wenn trotzdem über die Ursache derselben noch Zweifel herrschen, liegt das darin, daß die Untersuchung des gelben Harnfarbstoffs wohl eine der schwierigsten Aufgaben der biologisch-chemischen Forschung bildet. In der Tat haben die bisherigen Untersuchungen zu sehr divergenten, meistens gerade kontroversen Resultaten geführt. So wurde beinahe jeder im Harn gefundene Körper, dessen chemische Natur zur Zeit unbekannt war, für Harnfarbstoff oder für sein Zersetzungsprodukt gehalten.

Bereits im Jahre 1798 haben Fourcroy und Vauquelin<sup>1)</sup> versucht, die Ursache der Harnfarbe aufzuklären. Sie vermuteten, daß der Harnstoff daran schuldig wäre. Die Annahme ist von Berzelius widerlegt worden.

Ein Jahr später 1799 hatte der namhafte französische Chemiker Louis Proust seine ersten Untersuchungen über den Harnfarbstoff in spanischer Sprache veröffentlicht.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Fourcroy et Vauquelin, «Mémoire pour servir à l'histoire naturelle chimique et médicale de l'urine humaine, contenant quelques faits nouveaux sur son analyse et sur son altération spontanée», Annales d. Ch., Bd. XXXI, S. 68.

<sup>2)</sup> L. Proust, «Expériences sur l'urine», Traduites de l'espagnol des Annales de Historia natural, Annales d. Ch., Bd. XXXVI, auch Annales de Chimie et Physique, Bd. XIV, S. 257 (1826).



Proust behauptete, im normalen Harn wären zwei Farbstoffe enthalten, deren einer (*substance rosacée*) die Niederschläge von Harnsäure respektive von harnsauren Salzen, welche damals «*sédiment briqueté*» oder «*tartre incarnat*» genannt wurden, mitzureißen pflegen. Der andere Farbstoff wäre das dunkle Harz «*substance fauve et résineuse*», welches er durch die Wirkung von Schwefel- oder Salzsäure auf konzentrierten und vom größeren Teil der Mineralsalze durch Auskrystallisieren befreiten Harn erhielt. Beim Erhitzen eines solchen Harnsirups mit Mineralsäuren wurde sofort ein dickes, dunkles Öl ausgeschieden, welches bald zu einem schwarzen Pech sich umwandelte. Dieses Urinharz («*résine urinaire*»), welches in Wasser unlöslich, in Alkohol sowie in Alkalien leicht löslich war, wäre nach Proust die Ursache des Geruchs sowie der Farbe des Harns.

Neben dem Harz fiel beim Kochen des Harns mit Mineralsäuren ein schwarzes, eigentümliches Pulver aus, welches vom Urinharz durchaus verschieden war. Proust nannte es «*substance noire particulière*»: dasselbe war weder in Wasser noch in Alkohol löslich, löste sich dagegen sehr leicht in Alkalien und wurde aus solchen Lösungen durch Säuren in schwarzen Flocken ausgefällt, welche nach dem Trocknen dem gepulverten Asphalt ähnlich waren. Proust hatte den schwarzen Körper sehr genau beschrieben, mit der Beziehung desselben zu anderen Bestandteilen des Tierkörpers sich jedoch nicht befaßt.

Die von Proust erhaltenen Resultate wurden von Berzelius geprüft und bestätigt. Die Harnfarbe rührt nach Berzelius von «*Extraktivstoffen*» her. Unter den Extraktivstoffen fand er solche, welche in absolutem Alkohol löslich waren und mit Metallsalzen Niederschläge gaben und daher von ihm «*halophile*» genannt wurden, und andere, welche nur in verdünntem Alkohol (0,833) sich lösten. Alle Extraktivstoffe sind in Wasser löslich. Die in Wasser unlöslichen farbigen Verbindungen, welche durch Kochen des Harns mit Mineralsäuren erhalten wurden, und zwar sowohl das Harnharz wie das schwarze Pulver («*substance noire particulière*») sind als solche im Harn nicht ent-



halten, sondern entstehen aus den Extraktivstoffen infolge der Zersetzung derselben.<sup>1)</sup>

Lehmann hatte behufs Isolierung des Farbstoffs den Harn durch Ausfrieren von einem Teil seiner Salze befreit, dann durch Eindampfen im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz konzentriert, darauf mit Alkohol sowie mit Äther ausgezogen. «Der färbende Extraktivstoff» sollte nach diesem Autor unter anderen Zersetzungsprodukten Harnstoff liefern.<sup>2)</sup>

Scharling konzentrierte den Harn durch Ausfrierenlassen, zog ihn mit Äther aus und hielt für spezifischen Harnfarbstoff eine in Wasser unlösliche Substanz, welche aus dem Ätherauszug nach dem Verdunsten desselben und Auswaschen des Rückstandes mit Wasser gewonnen wurde; nach dem Erwärmen der Substanz mit Kalilauge isolierte er den vermeintlichen Harnfarbstoff in grauen Flocken durch Fällen mit Schwefelsäure und reinigte denselben schließlich durch Aufnahme mit Äther. Den erhaltenen Körper nannte Scharling «Omichmyloxid» («ουμχμα» = Harn). Das Omichmyloxid gab beim Zerlegen mit Mineralsäuren Benzoessäure, woraus zu schließen ist, daß es zum größten Teil aus Hippursäure bestand, welche damals noch unbekannt war. Das Chlorieren sowie Nitrieren des Omichmyls ergab auch Substitutionsprodukte der Benzoessäure.<sup>3)</sup>

Im Jahre 1844 hatte Liebig die vergessen gewesene Beobachtung von Proust zum Gegenstand einer Untersuchung gemacht. Er erhielt das schwarze Harnharz (résine urinaire). Dasselbe entsteht nach ihm neben Essigsäure durch Zerfall des Harnfarbstoffs infolge der Wirkung des Sauerstoffs der Luft. Liebig unterschätzte die Beobachtung von Proust, als er ihm wohl mit Unrecht vorwarf, daß seine Verbindung nur aus einem Harn erhältlich wäre, welcher der Fäulnis unterlag.<sup>4)</sup>

Marcet dampfte den Harn zur Trockne ein, zog den Rückstand mit Alkohol aus, fällte aus der alkoholischen Lösung den Harnstoff mit Äther, dunstete schließlich das alkohol-äthe-

<sup>1)</sup> Berzelius, Lehrbuch d. Chemie, 4. Auflage (1840), Bd. IX, S. 553.

<sup>2)</sup> Journ. f. prakt. Ch., Bd. XXV, S. 1.

<sup>3)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph., Bd. XLII, S. 265 (1842).

<sup>4)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph., Bd. L, S. 168 u. 172 (1844).



rische Filtrat ein und sah den Harnfarbstoff in dem rötlich gefärbten harzigen Rückstand von saurer Reaktion, welcher dabei zurückblieb.<sup>1)</sup>

Scherer war der erste, welcher die Methode der Gewinnung der Extraktivstoffe von Berzelius ungenügend fand, versuchte etwaige unbekannte Körper aus dem Harn mit Bleiessig auszufällen und die Bleiniederschläge mit Mineralsäure zu behandeln. Er betrachtete entgegen der Definition von Berzelius als Extraktivstoffe diejenigen Körper, welche beim Zersetzen eine braune Humussubstanz liefern, sie wären in Wasser nicht leicht, dagegen in Alkohol und verdünnten Alkalien leicht löslich.<sup>2)</sup>

Harley extrahierte einen vorher konzentrierten Harn mit Alkohol, fällte den alkoholischen Auszug mit Kalkwasser und zog den entstandenen Niederschlag mit salzsäurehaltigem Alkohol aus: nach dem Verdunsten des Alkohols erhielt er den vermeintlichen Harnfarbstoff in der Form eines amorphen Rückstandes von rotbrauner Farbe und harziger Beschaffenheit, welcher in Wasser nicht, dagegen in Alkohol, Äther, sowie in Alkalien leicht löslich war und beim Verbrennen eine zum größeren Teil aus Eisenoxyd bestehende Asche hinterließ. Er nannte den Harnfarbstoff auch Urohämatin und leitete ihn von Blutfarbstoff ab.<sup>3)</sup>

Tichborne gründete die Methode der Darstellung von Harnfarbstoff auf die Beobachtung von M. de Luna, welcher zur Entfärbung der Lösungen von Harnfarbstoff einer ammoniakalischen Lösung von Kupferniträt sich bediente. Tichborne versetzte nämlich mit einer solchen Kupferlösung einen normalen, bis zu dem spezifischen Gewicht von 1,163 konzentrierten Harn direkt. Nach dem Neutralisieren dieser Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure fiel aus derselben sofort ein Kupferniederschlag, welcher die ganze Menge von Harnfarbstoff, sowie außerdem noch etwas Harnstoff sowie Eiweiß enthielt.

<sup>1)</sup> Biblioth. Univ. de Genève, J. 1852, S. 144, zit. nach Schunck und Thudichum.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. LVII, S. 180 (1857).

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Chem., Bd. XIV, S. 164.



Der aus dem Kupferniederschlag nach dem Zerlegen desselben mit Schwefelsäure in Lösung übergegangene Farbstoff wurde schließlich mittels Extraktion mit Alkohol-Äther vom Harnstoff, von einem roten Farbstoff und von sonstigen Beimengungen befreit, sowie schließlich durch Umfällung mit der genannten Kupferlösung gereinigt. Der Harnfarbstoff von Tichborne war in Wasser sowie im gewöhnlichen Weingeist löslich, unlöslich dagegen im absoluten Alkohol sowie in Äther. Vom basischen Bleiacetat wurde er aus der Lösung vollständig ausgefällt. Er enthielt nur selten Eisen. Seltsamerweise angeblich auf Grund der Resultate von Elementaranalysen ( $C = 67,8\%$ ,  $H = 4,23\%$ ,  $N = 8,56\%$ ,  $O = 19,41\%$ ), wirklich jedoch von spekulativen Deduktionen geleitet, betrachtete Tichborne den Harnfarbstoff als ein Zersetzungsprodukt der Hippursäure.<sup>1)</sup>

In der Zeit von 1856—1866 war mit Untersuchung der Farbstoffe und der Extraktivstoffe des Harns Edward Schunck<sup>2)</sup> beschäftigt. Zu Farbstoffen («colouring matters») zählte Schunck Körper, welche teils als solche, teils in Form ihrer Zersetzungsprodukte im Harn auftreten, also das Harnindikan, den rosa-roten Farbstoff der Harnsäureniederschläge, sowie auch den schwarzen Körper von Proust («peculiar black substance»), welchen er für ein Derivat des Indigo hielt, und welche in Wasser entweder gar nicht oder nur teilweise löslich sind. Als Extraktivstoffe dagegen betrachtete er in Übereinstimmung mit Berzelius die in Wasser löslichen Körper, welche nach ihm die Farbe des Harns bedingen sollten. Die Extraktivstoffe wurden nun Gegenstand einer eingehenden Untersuchung von Schunck. Er isolierte dieselben aus dem Harn, welcher vorher mit Bleizucker behandelt wurde, durch Fällung mit Bleiessig, Zerlegen des Bleiniederschlags mit Schwefelsäure, Entfernen der Schwefelsäure aus der Lösung mit Bleicarbonat, des Bleis aus dem Filtrat mit Schwefelwasserstoff, der noch in Lösung enthaltenen Salzsäure durch Ausschütteln mit Quecksilberoxyd und metallischem Quecksilber, Ausfällen des in Lösung übergegangenen Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff und Ausziehen des er-

<sup>1)</sup> Chemic. News, Bd. V (1862), S. 163.

<sup>2)</sup> Proceedings of the Royal Society, Bd. XVI, S. 73 u. 126.



haltenen Filtrats nach dem Einengen desselben mit Äther und dann Alkohol. Es blieb ein in Alkohol und Äther nicht, in Wasser dagegen leicht löslicher Rückstand zurück, welcher die Extraktivstoffe in der Form von Kalium- und Calciumverbindungen enthielt. Da nach dem Ausfällen der Basen als Sulfate die erhaltenen freien Extraktivstoffe in Alkohol löslich waren, so war der genannte Autor der Ansicht, worin er übrigens mit Berzelius einig war, daß der Harn in Alkohol unlösliche Extraktivstoffe überhaupt nicht enthält.<sup>1)</sup>

Nach Schunck wären im Harn nämlich zwei Extraktivstoffe enthalten. Eine von diesen Verbindungen wäre in Alkohol und Äther löslich («urian»): die andere wäre löslich in Alkohol, unlöslich dagegen in Äther («urianine»).

Die Zusammensetzung dieser Körper wäre konstant. Differenzen unter den Prozentzahlen wären nur die Folgen der Zersetzung, welcher diese Verbindungen sehr leicht unterliegen. Ihre elementare Zusammensetzung wäre die folgende:

	Urian	Urianin
C	51,23 %	46,24 %
H	5,38 %	5,47 %
N	1,26 %	2,83 %
O	42,13 %	45,46 %

Ihre geringen Stickstoffgehalte deuten auf ihre hohen Molekulargewichte hin.

Diese zwei Verbindungen verhielten sich nach Schunck auch verschieden beim Erhitzen mit Mineralsäuren; während «Urian» nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure einen braunen harzigen, in Alkohol löslichen Niederschlag («Uroretin») lieferte, gab das Urianin bei gleicher Behandlung einen flockigen schwarzen Niederschlag, welcher nach dem Trocknen zu einem schwarzen Pulver wurde (Uromelanin), welches in Alkohol vollkommen unlöslich, in verdünntem Ammoniak dagegen leicht löslich war, aus diesen Lösungen durch Mineralsäuren wieder gefällt wurde und folglich an die «Substance noire particulière» erinnerte.

<sup>1)</sup> l. c. S. 130.



Fast gleichzeitig mit E. Schunck hatte Thudichum<sup>1)</sup> mit der Untersuchung der Harnfarbstoffe sich befaßt. Er erhielt den Farbstoff, welchen er Urochrom nannte, aus dem Harn auf drei verschiedenen Wegen.

1. Er extrahierte den Harn nach dem Einengen und Ansäuern mit Salzsäure mit Äther und gewann aus dem Ätherauszug nach dem Verdunsten des Äthers neben Hippursäure eine harzige Substanz, welche an den Wänden der Gefäße haftete. Dieselbe wurde in Wasser gelöst, aus der Lösung mit Bleiessig gefällt, aus dem Bleiniederschlag bald mit Schwefelsäure, bald mit Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzt, an Baryt gebunden und nach der Ausfällung des Barytüberschusses mit Kohlensäure, aus der Lösung mit Quecksilberacetat gefällt. Nach dem Zerlegen des Quecksilberniederschlags mit Schwefelwasserstoff und Austreiben des letzteren mit Wasserstoff wurde der Farbstoff schließlich in Lösung erhalten.

2. Er entfernte zuerst aus dem Harn mit Kalkmilch oder mit essigsauerm Baryum unter Zusatz von Barythydrat die Phosphorsäure, die Schwefelsäure, sowie einen Teil von Harnsäure, fällte das Filtrat unter Erwärmen mit essigsauerm Blei und Ammoniak und stellte den Farbstoff aus dem Bleiniederschlag in ähnlicher Weise dar wie beim Befolgen der ersten Methode.

3. Er behandelte den Harn wie vorher mit Kalkmilch oder Barythydrat, fällte den Farbstoff aus dem Filtrat mit einer gesättigten Lösung von Quecksilberchlorid und gewann ihn schließlich in alkoholischer Lösung nach dem Zerlegen des in Alkohol aufgeschwemmten Quecksilberniederschlags mit Schwefelwasserstoff. Den mit Hilfe dieser Methode erhaltenen Körper hielt Thudichum für eine einheitliche Verbindung, obwohl er denselben einer Elementaranalyse nicht unterwarf. Das Urochrom von Thudichum war eine amorphe, leicht in Wasser, etwas schwierig in Äther, noch schwieriger in Alkohol lösliche Verbindung. Dieselbe zersetzte sich in der Lösung unter Beteiligung des Sauerstoffs der Luft schon bei Zimmertemperatur, leicht beim Erwärmen, gab Niederschläge mit salpetersauren

<sup>1)</sup> The brit. medic. Journ., Bd. II, S. 509 (1864).



und essigsauren Salzen von Blei, Silber und Quecksilber, gab keine Schwärzung beim Kochen mit Bleisalzen in alkalischer Lösung und enthielt Schwefel überhaupt nicht. Beim Kochen mit Mineralsäuren gab Urochrom folgende Zersetzungsprodukte:

1. Das Uropittin, *résine fauve*, von Proust.
2. Eine harzige Säure «*resinous acide*» («*omicholic acide*»).
3. Das Uromelanin («*particular black matter of Proust*»).

Später hat Thudichum die Richtigkeit der Angaben von Maly<sup>1)</sup> bestritten, daß das Urochrom mit Urobilin verwandt wäre. Die zwei Farbstoffe sind nach ihm sowohl in chemischen wie in physikalischen Eigenschaften voneinander durchaus verschieden.<sup>2)</sup>

Nach den Arbeiten von Schunck und Thudichum ist 27 Jahre hindurch keine Untersuchung über das Urochrom erschienen. Die Schwierigkeit, solche Körper wie Harnfarbstoff auf chemischem Wege zu erforschen, ließ zu spektroskopischen Untersuchungsmethoden greifen. Da das Urochrom charakteristische Absorptionsbänder im Spektrum nicht gab, wurde überhaupt an der Existenz desselben gezweifelt und angenommen, das Urobilin wäre der einzige im Harn enthaltene spezifische gelbe Farbstoff. Jedoch bereits im Jahre 1876 hatte Vierordt<sup>3)</sup> an der Hand von spektrophotometrischen Messungen dargelegt, daß ein normaler Harn mehr als einen gelben Farbstoff enthält. Die Untersuchung von Vierordt wurde auch in der Tat im Jahre 1894 von Garrod, welcher es unternahm, die Frage des Harnfarbstoffs aufzuklären,<sup>4)</sup> in Betracht gezogen.

Der spezifische gelbe Farbstoff des Harns kann Urobilin nicht sein. Sehr schwache Lösungen von Urobilin geben ein deutliches Absorptionsband am Spektrum von ganz bestimmter Lage, welches viel deutlicher ist, als dasselbe Absorptionsband, welches am Spektrum eines normalen Harns zu beobachten ist. Die Mengen von Urobilin, welche aus einem normalen, wie

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. CLXIII, S. 90 (1872).

<sup>2)</sup> Journ. of the Chemic. Society (New series), Bd. XIII, S. 397 und 401 (1875).

<sup>3)</sup> Die quantitative Spektralanalyse (Tübingen 1876), S. 78.

<sup>4)</sup> Proceedings of the Royal Society, Bd. LV, S. 394.



auch diejenigen, welche aus pathologischem Harn erhalten wurden, waren viel zu gering, um nach dem Auflösen und entsprechender Verdünnung der Lösung eine der Farbe des Harns an Intensität ähnliche gelbe Färbung zu geben.

Wenn also weder Urobilin noch Hämatoporphyrin, welches im normalen Harn nur in äußerst geringer Menge gefunden wurde, oder Uroerythrin, die Ursache der Farbe des normalen Harns sein können, muß dieselbe nach Garrod von einem gelben Farbstoff herrühren, welcher in größeren Mengen im Harn enthalten ist und welcher sogar in konzentrierter Lösung Absorptionsbänder am Spektrum nicht erscheinen läßt.

Seine Methode der Untersuchung von Harn in der fraglichen Richtung gründete Garrod auf die unveröffentlichte Beobachtung von Lewis Jones. L. Jones hatte nämlich bemerkt, daß der gelbe Farbstoff, welcher aus dem Bleiniederschlag des Harns in Freiheit gesetzt wurde, in Chloroform unlöslich war, während Urobilin in diesem Lösungsmittel sich leicht löst.

In sehr verdünnten Lösungen gibt das Urobilin bekanntlich einen Absorptionsstreifen, welcher dicht bei F liegt, während ein normaler Harn eine verschwommene Verdunkelung des Spektrums in der Nähe der Linie F liefert, welche von dem scharfen Absorptionsband des Urobilins durchaus verschieden ist; zudem erscheint dieselbe erst bei der Beobachtung des Harns in dickeren Schichten. Ohne die Gegenwart von Spuren von Urobilin im Harn zu bestreiten, neigt Jones zu der Annahme, daß der normale Harn seine Farbe einem gelben Körper verdankt, für welchen der Name Urochrom behalten werden kann. Auch die Farbe des Fieberharns wird nicht durch Urobilin bedingt, sondern durch die Gegenwart größerer Mengen dieses Farbstoffs nur etwas verändert. Behufs Entfernung des Urobilins aus dem Harn sättigte Garrod denselben mit Ammoniumsulfat; das Filtrat schüttelte er mit absolutem Alkohol, welcher den gelben Farbstoff auszog. Die alkoholische Lösung wurde nach der Verdünnung mit Wasser wiederum mit Ammoniumsulfat gesättigt. Die über der farblosen Salzlösung stehende Alkoholschicht wurde nach Zusatz von Ammoniak eingeeengt und der Rückstand nach Entfernung der in der Lösung noch



enthaltenen Indoxylschwefelsäure noch einmal mit absolutem Alkohol ausgezogen. Der alkoholische Auszug war orangerot gefärbt. Zur weiteren Reinigung wurde der Farbstoff aus der alkoholischen Lösung mit einem Überschuß von Äther gefällt. Er wurde auf diese Weise in dunkelgelben amorphen Flocken erhalten. Nach dem Filtrieren haftete derselbe stark am Filter und pflegte seine ursprüngliche Löslichkeit in Alkohol zu verlieren. In Äther war der Farbstoff vollkommen unlöslich und war auch frei von Farbstoffen, welche Absorptionsbänder am Spektrum liefern. Die Lösung des Urochroms von Garrod gab eine Fluorescenz mit der ammoniakalischen Chlorzinklösung nicht, lieferte keine Absorptionsbänder und ließ am Spektrum nur eine starke Absorption der violetten Strahlen beobachten. Seine wässerigen Lösungen bräunten sich bei längerem Stehen sowie auch beim Erwärmen. Sie wurden auch braun durch Zusatz von Lauge, sowie auch rotbraun nach dem Zusatz von Mineralsäuren. Beim Eindampfen mit Salzsäure oder Schwefelsäure hinterließen dieselben einen Rückstand, welcher in Chloroform sowie in Alkohol beim Erwärmen unter Färbung der Lösung in sepiaschwarz teilweise löslich war. Der in Wasser, Alkohol und verdünnten Säuren unlösliche Teil dieses Rückstandes war sehr leicht löslich in verdünntem Ammoniak und erinnerte an das Uromelanin von Thudichum, welches bereits früher von Proust beobachtet worden war. Gegenüber Salzen der schweren Metalle verhielt sich der von Garrod untersuchte Farbstoff gleich wie das Urochrom von Thudichum.

Die Eigenschaften dieser Farbstoffe differierten in der Darstellung dieser zwei Autoren darin, daß das Urochrom von Garrod in Äther ganz unlöslich war, und daß es bei der Zersetzung mit Mineralsäuren ätherlösliche Spaltungsprodukte («red resine» und «omicholic acid» von Thudichum) nicht gab. Der Verlauf der Spaltung des Urochroms von Garrod beim Erhitzen mit Mineralsäuren war vielmehr dem Verhalten des Urianin von Schunck, welches bei der gleichen Behandlung nur Uromelanin lieferte, ähnlich. Elementaranalysen des Farbstoffs hat Garrod nicht ausgeführt.



Alle die oben referierten Arbeiten, von derjenigen von Proust an bis zu jenen von Garrod, welche in dem Zeitabschnitt von etwa einem Jahrhundert erschienen sind, geben ein Zeugnis von den Schwierigkeiten, welche die Untersuchung des Harnfarbstoffs bietet. Trotz mühevoller Untersuchungen einer Reihe von hervorragenden Forschern blieb sowohl die Natur der Extraktivstoffe wie diejenige des Harnfarbstoffs unaufgeklärt. Das Urochrom wurde in reinem Zustand nicht erhalten. Elementaranalysen von vermeintlichem Harnfarbstoff wurden nur an Zersetzungsprodukten desselben ausgeführt und zwar an verschiedenen. Der Name «Extraktivstoffe» und die nähere Bezeichnung seines Inhalts von Berzelius, welche auch von Schunck angenommen wurde, hatte sich als ungenügend erwiesen. Unter denselben waren sehr verschiedene Körper und zudem auch solche von sehr komplizierter Zusammensetzung gemeint.

Infolge dessen haben auch die früheren Forscher oft das *ignotum per ignotius* erklärt.

Neues Licht auf die Extraktivstoffe wurde erst durch die Entdeckung der Oxyproteinsäure von Bondzyński und Mitarbeiter verbreitet.<sup>1)</sup> Der Ideengang, welcher zu dieser Beobachtung geführt hatte, war aber von dem Ausgangspunkt früherer Forscher gänzlich verschieden. «Wenn wir» — sind die Worte von Bondzyński — «von Harnsäure und von Kreatinin, deren Entstehung nicht direkt von der Zersetzung der Eiweißstoffe abgeleitet wird, sowie von einigen anderen Stickstoffverbindungen, welche teils in vereinzelt abnormen Fällen teils im normalen Harn, jedoch in geringer Menge gefunden wurden, absehen, ist der Harnstoff gegenwärtig als der einzige bekannte Ausdruck des Stoffwechsels des Eiweißes zu betrachten. Man begnügte sich mit dieser Annahme und doch, es genügt ein Blick auf die einfache Formel des Harnstoffs, um zu erkennen, daß der Abstand, welcher den Harnstoff von Eiweißstoffen trennt, so weit ist, daß der Harnstoff nur das Endresultat eines sehr komplizierten, uns jedoch unbekanntes Prozesses des Abbaues von Eiweiß ist. Daß dieser Prozeß eine Reihe von Stadien durch-

<sup>1)</sup> Bondzyński und Gottlieb, Zentralblatt f. d. med. Wiss. J. 1897, Nr. 33.



zulaufen hat, und daß er in einem gewissen Stadium sozusagen sich fixieren und beobachten läßt, schien uns unzweifelhaft. Von diesem Gedanken geleitet stellten wir Versuche mit Phosphorvergiftung von Tieren an, in der Erwartung, daß durch die Vergiftung mit Phosphor, welche eine so starke Störung des Stoffwechsels zur Folge hat, eben die Prozesse der Spaltung und Oxydation, welche das Wesen des Stoffwechsels darstellen, gestört werden. In der Tat fanden wir im Harn der mit Phosphor vergifteten Tiere eine bisher unbekannte Verbindung, welche wir Oxyproteinsäure nennen, aber noch mehr, wir haben uns bald überzeugt, daß diese Verbindung auch im normalen Harn von Menschen und Tieren enthalten ist und daß dieselbe nach der Vergiftung der Tiere mit Phosphor nur in gesteigerter Menge im Harn ausgeschieden wird.<sup>1)</sup>

Das durch die Entdeckung der Oxyproteinsäure eröffnete Gebiet wurde durch die Untersuchungen von Bondzyński und Panek<sup>2)</sup> sowie diejenige von Bondzyński, Dombrowski und Panek<sup>3)</sup> erweitert. Das Resultat aller dieser Forschungen war die Entdeckung im Harn von drei stickstoff- und schwefelhaltigen Säuren, welche von einander getrennt und unterschieden wurden auf Grund des verschiedenen Verhaltens hauptsächlich gegenüber essigsauren Salzen von Blei und Quecksilber sowie von Elementaranalysen, nämlich außer Oxyproteinsäure, Alloxyproteinsäure und Antoxyproteinsäure.

Bei näherer Untersuchung der Baryum- und Calciumsalze von Proteinsäuren, welche aus dem Bleiniederschlag gewonnen wurden, habe ich bemerkt, daß bei fraktionierter Fällung der Lösungen dieser Salze mit Quecksilberacetat in den ersten braun gefärbten Fraktionen eine schwefelreichere Verbindung gefällt wurde. Da der Schwefelgehalt der Quecksilber- sowie der Silbersalze mit der Intensität der Färbung derselben zu steigen schien, so lag — und zwar ungeachtet dessen, daß

<sup>1)</sup> Przegład lekarski (Krakau), 1897.

<sup>2)</sup> Rozprawy akademji umiejetności (Krakau), 1902, und Ber. der Deutsch. chem. Ges., 1902.

<sup>3)</sup> Rozprawy akademji umiejetności, 1905, und Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 83.



Thudichum und Garrod mit keinem Wort erwähnen, daß ihr Urochrom schwefelhaltig wäre — die Frage nahe, ob die schwefelreichere Verbindung nicht etwa die färbende Substanz, also der Harnfarbstoff wäre, welches von Thudichum Urochrom genannt und von Garrod näher beschrieben wurde. In Verfolgung unserer damaligen Aufgabe der Reindarstellung der Alloxyproteinsäure habe ich versucht, den den gefärbten Präparaten der Baryum- und Calciumsalze dieser Säure anhaftenden Farbstoff mit Tierkohle zu entfernen. Da diese Methode der Entfärbung starke Verluste an Material offenbar infolge der Adsorption der Alloxyproteinsäure durch Tierkohle mit sich zog, habe ich versucht den Farbstoff mit Kupferacetat zu fällen. In der Tat gaben alle Lösungen der Proteinsäuren, welche Farbstoff enthielten, nach einigem Stehen mehr oder weniger reichliche grau- oder braungrüne flockige Niederschläge mit Kupferacetat. Die Lösungen wurden dadurch entfärbt und die aus den farblosen Filtraten erhaltenen Salze der Alloxyproteinsäure gaben keine Fällungen mehr mit Kupferacetat. Ferner habe ich mich überzeugt, daß die Kupferverbindung, welche vollständig frei von Purinkörpern war, außer Stickstoff noch Schwefel enthielt, und durch die Elementaranalyse festgestellt (C 36,76%, H 3,56%, N 9,72%, S 2,57%, Cu 20,10%), daß dieselbe schwefelreicher war als die Alloxyproteinsäure.

In der Entdeckung der Proteinsäuren und der Untersuchung der oben genannten Autoren über diese Säuren, welche in keinem weder normalen noch pathologischen Harn fehlen, wurde die Grundlage gewonnen zum Verständnis und zur Aufklärung aller dieser Gegensätze und Zweifel in den Anschauungen von früheren Autoren über die Frage der Extraktivstoffe und des Harnfarbstoffs.

Es genügt, an das Verhalten der freien Proteinsäuren sowie ihrer Salze gegen Mineralsäuren und gegen Lösungsmittel wie Alkohol und Äther, sowie an die große Empfindlichkeit des Urochroms gegenüber der Wirkung von verdünnten Mineralsäuren und von Luftsauerstoff zu denken,<sup>1)</sup> um zu erkennen.

<sup>1)</sup> Bondzyński, Dombrowski und Panek, l. c.



welche Gemengen von Körpern von den älteren Autoren für einheitliche Verbindung gehalten wurden.

So hatte L. Proust wohl Zersetzungsprodukte von Proteinsäuren sowie von Urochrom in Händen gehabt. Die Extraktivstoffe von Berzelius bestanden einerseits aus Alkalisalzen der Oxy- und der Antoxyproteinsäure, andererseits aus einem Gemenge dieser Salze mit den Alkalisalzen der Alloxyproteinsäure sowie des Urochroms. Liebig, welcher die Versuche von Proust wiederholt hatte, hatte mit denselben Zersetzungsprodukten wie seine Vorgänger zu tun. Der Bleiniederschlag von Scherer enthielt offenbar die Säuren der Alloxyproteingruppe und das Urochrom. Harley untersuchte das Gemenge von Calciumsalzen der Alloxyproteinsäure, des Urochroms sowie der Oxyproteinsäure. Die Kupferniederschläge von Tichborne bestanden aus den Kupfersalzen des Urochroms, welches mit Kupferverbindungen der Purinkörper sowie mit Kupferphosphat verunreinigt war.

Lehmann, Scharling und Marcet, welche die in reinem respektive in alkoholhaltigem Äther löslichen Verbindungen erhielten, hatten wohl jene Säure oder Säuren untersucht, welche regelmäßig die alloxyproteinsauren Salze verunreinigten.<sup>1)</sup> Diese Säure, welche näher nicht untersucht wurde, gab ein in Wasser leicht, in konzentriertem Alkohol dagegen schwer lösliches Baryum- und Calciumsalz, ein in verdünntem Alkohol schwer lösliches Silbersalz, sowie Fällungen mit Bleiessig und Quecksilberacetat, enthielt bekanntlich Stickstoff, war aber schwefelfrei.

Das «Urian» von Schunck bestand wahrscheinlich ebenfalls aus den obengenannten Säuren, welchen wohl andere Verbindungen noch beigemischt waren. Das Uranin bildete wohl ein Gemenge von Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe und des Urochroms mit Kohlenhydraten, was aus dem niedrigen Stickstoffgehalt desselben zu schließen ist. Beim Reinigen seines Urianins beobachtete zwar Schunck, daß durch Schütteln der aus dem Bleiniederschlag in Freiheit gesetzten Verbindung mit Quecksilberoxyd eine organische Quecksilberverbindung aus-

<sup>1)</sup> Bondzyński, Dombrowski und Panek. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 107.



gefällt wurde, nach deren Zerlegen eine braune Lösung resultierte, welche mit Bleiessig einen schmutzigen Niederschlag lieferte, und er hatte sogar das Bleisalz dieser Verbindung einer Analyse unterworfen (C = 20,40%, H = 2,55%, N = 3,59%, O = 20,65%, PbO = 52,81%), jedoch, über den ziemlich hohen Stickstoffgehalt dieser Verbindung verwundert, zählte er dieselbe nicht zu den Extraktivstoffen und vermutete auch nicht, daß sie etwa Schwefel enthielt. Daß diese Verbindung jedoch der Alloxyproteinsäure sehr nahe stand, ergibt sich aus dem Vergleich ihrer, aus den für ihr Bleisalz erhaltenen Prozentzahlen berechneten Zusammensetzung mit der Zusammensetzung der Alloxyproteinsäure.

Die Verbindung von Schunck.

C 43,24%

H 5,41%

N 7,60%

O 43,75%

Alloxyproteinsäure.

C 41,24%

H 5,70%

N 13,55%

S 2,19%

O 37,23%

Thudichum hatte sich bei seinen Untersuchungen über den Harnfarbstoff allzu verschiedener Methoden bedient, um zu einheitlichen Körpern zu gelangen. So hatte er durch Extraktion des mit Salzsäure angesäuerten Harnsirups mit Äther wohl dieselben Verbindungen ausgezogen wie früher Lehmann, Scharling, Marcet und Schunck, nämlich die bereits erwähnten ätherlöslichen Säuren; dagegen beim Vorgehen nach den beiden anderen Methoden erhielt er wohl ein Gemenge von Baryumsalzen, von Säuren der Alloxyproteingruppe und des Urochroms. Sein «Uropittin», seine «Omicholsäure» sowie das «Uromelanin» waren sicher Zersetzungsprodukte der Proteinsäuren. Schließlich hatte Garrod auch neben dem gelben Harnfarbstoff Oxyproteinsäure und Antoxyproteinsäure in seinen Händen.

Die «résine rousse» und die «substance noire particulière» von L. Proust, die «Extraktivstoffe» von Berzelius, die «färbenden Extraktivstoffe» von Lehmann, das «Omichmyloxyd» von Scharling, die «principes immédiats» von Marcet, das «normal urine pigment» von Tichborne, «das Urian» und



das Urianin» von Schunck, sowie das «Urochrom» von Thudichum und Garrod — stellen also nur verschiedene Namen dar, mit denen nicht chemische Individuen, sondern Körpergemenge benannt wurden, welche hauptsächlich bald aus Proteinsäuren, bald aus ihren Zersetzprodukten bestanden. Aus diesem historischen Überblick ist ersichtlich, daß von den älteren Autoren die Frage der Harnfarbe ziemlich allgemein an das Wesen «der Extraktivstoffe» geknüpft wurde. Das ist wohl das positive Resultat ihrer Forschungen, denn wenn auch der Name «Extraktivstoffe» aus der Harnlehre zu streichen ist, so hatte die Entdeckung und Erforschung der Proteinsäuren durch Bondzynski und seine Mitarbeiter doch den Weg zur Erforschung des Harnfarbstoffs gebahnt. In der Tat habe ich bei der Forschung nach der Ursache der Differenzen im Prozentgehalte des Schwefels von verschiedenen Präparaten der Salze der Alloxyproteinsäure beobachtet, daß dieselben mit einem gelben Farbstoff verunreinigt waren. Dieser Farbstoff erwies sich als schwefelhaltig, und zwar schwefelreicher als die Alloxyproteinsäure und zeigte Ähnlichkeit mit dem Urochrom von Thudichum und Garrod.

Beim normalen Stoffwechsel entsteht offenbar neben farblosen Proteinsäuren auch eine farbige Verbindung, welche mit ihnen eine Gruppe von unter einander nahe verwandten Körpern bildet, denen früher der Name «Extraktivstoffe» gegeben wurde, welche verschiedene Stufen des Aufbaus des Eiweißmoleküles im Organismus darstellen. Die Eigenschaften dieses Farbstoffs, für dessen Bezeichnung der Name «Urochrom» beibehalten werden mag, wurde bereits kurz beschrieben.

Die Feststellung der Zusammensetzung seiner Salze, sowie des aus den Salzen erhaltenen freien Farbstoffs, das weitere Studium seiner chemischen Eigenschaften, sowie auch einiger seiner Zersetzprodukte, die Aufklärung seiner Beziehung zu Urobilin und folglich auch zu Blutfarbstoff, ist der Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



## B. Experimentelles.

### I. Über die Gewinnung des Urochroms.

Da mit Kupferacetat das Urochrom von allen anderen Proteinsäuren getrennt werden konnte, so war es klar, daß die Fällung mit Kupferacetat die Grundlage eines jeden Versuches der Darstellung des Urochroms bilden mußte. Andererseits brachte die Natur der uns interessierenden Verbindung und zwar insbesondere ihre Unbeständigkeit mit sich, daß die Methode ihrer Gewinnung Änderungen unterlag, bevor sie endgültig festgestellt werden konnte. Ich habe mich anfangs der folgenden Methode der Darstellung des Urochroms bedient.

Ia. Mit einer Mischung von Kalkmilch und Baryumhydratlösung entfernte ich zuerst die Phosphorsäure, die Schwefelsäure und die Harnsäure.<sup>1)</sup> Nach der Ausfällung des Kalk- und Barytüberschusses mittels Kohlensäure dampfte ich den Harn im Vakuum bei 50–55° C. zur Konsistenz eines dünnen Sirups ein, welchen ich von einem großen Teile von Natriumchlorid und Harnstoff durch wiederholtes Eindampfen und Auskrystallisieren in der Kälte befreite. Den verbliebenen dicken Sirup fällte ich mit einer Mischung von Alkohol und Äther. Den zurückgebliebenen, in Alkoholäther unlöslichen Rückstand löste ich im Wasser auf, und um das Urochrom samt den Säuren der Alloxyproteingruppe zu erhalten, fällte ich die Lösung mit Bleiessig. Aus dem Bleiniederschlage erhielt ich auf die bekannte Weise die chlorfreien Kalk- oder Baryumsalze der Proteinsäuren.

Aus der Lösung dieser Verbindungen wurde nun durch Kupferacetat die Urochromkupferverbindung ausgefällt.

Da jedoch analytische Versuche, welche in Verfolgung der Frage über die Ausscheidung von Urochrom unternommen wurden, mich belehrt hatten, daß bei diesem Verfahren ein

---

<sup>1)</sup> Baysson, Journal de Pharmacie et de Chimie, Bd. VI, S. 20 (1852).

E. D. Baftalowskij, Jahresber. f. Tierchem., 1888, S. 128.

H. Seelmuyden, Zeitschr. f. anat. Chem., Bd. XXXI, S. 166 (1892).



nicht geringer Teil von Urochrom verloren ging<sup>1)</sup> und zwar wahrscheinlich infolge einer beim Eindampfen des Harns — welcher freies, bei der Umsetzung des Barythydrats mit Alkaliphosphaten resp. Sulfaten entstandenes Alkali enthielt — in vacuo etwa stattgefundenen Zersetzung.

Ib. So wurde bei weiterer Darstellung der Farbstoff, wenn es darauf ankam, größere Mengen davon zu erhalten, der Harn nach der Behandlung mit Baryum- und Calciumhydrat direkt mit Kupferacetat gefällt.

II. Und schließlich, um die Entstehung des freien Alkalis und die damit verbundene Gefahr zu vermeiden, wurde der Farbstoff in der Form seiner Kupferverbindung aus der Lösung eines Gemenge von Baryum- resp. Calciumsalzen der Säuren der Proteinsäuregruppe gefällt, welches auf folgende Weise bereitet wurde.

Der Harn wurde sogleich im Vakuum konzentriert. Der erhaltene Sirup wurde von dem dabei reichlich gebildeten kristallinen Salzniederschlag abfiltriert und darauf mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis ein rotes Congopapierchen sich eben leicht blau färbte, worauf das doppelte Volumen konzentrierten Alkohols hinzugefügt wurde. Die saure alkoholische Flüssigkeit wurde von den durch den Alkohol ausgefallenen Alkalisulfaten abfiltriert mit Wasser verdünnt und mit Barythydrat abgestumpft. Den Barytüberschuß entfernte ich sofort mit Kohlensäure, worauf ich die vom Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit im Vakuum konzentrierte. Nach der durch Abkühlung verursachten Auskrystallisierung eines Teiles des Natriumchlorids und Harnstoffs fällte ich mit starkem Alkohol die Baryumverbindungen der Proteinsäuren, welche nur teils direkt teils nach einer Umwandlung in Calciumsalze zur Fällung mit Kupferacetat dienten.

<sup>1)</sup> In zwei Fällen, welche darauf untersucht wurden, wurde die Menge des Stickstoffs in Kupferniederschlägen aus 100 cem Harn zu:

0,0168 resp. 0,0142 g

gefunden. Während nach dem Einengen dieser Harns in vacuo die in den Kupferniederschlägen aus 100 cem Harn gefundenen Stickstoffmengen nur:

0,0077 resp. 0,0070 g

betrugen.



## II. Die Reindarstellung und Elementaranalysen des Calcium-, des Silber- und des Kupfersalzes des Urochroms sowie der freien Säure.

Den rohen Urochromkupferniederschlag, welchen ich direkt aus 75 l Harn nach Ausfällung der Phosphate, Sulfate und der Harnsäure mittelst Baryt und Kalk (Methode Ib) erhalten und genau ausgewaschen hatte, habe ich im Wasser suspendiert und bei 50° C. mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das braunkirschrote Filtrat befreite ich vom H<sub>2</sub>S unter leichter Erwärmung der Flüssigkeit und unter vermindertem Druck mittels Durchleitung eines Kohlensäurestromes. Die auf Lackmuspapier stark sauer reagierende Flüssigkeit enthielt 1,2 g Chlor auf NaCl berechnet, obwohl freie Salzsäure darin mit rotem Congopapier nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Trockenrückstand der gesamten Flüssigkeit betrug 16 g, die Asche 0,68 g.

Die bräunlichrote Flüssigkeit nahm nach Hinzufügung von Kalkwasser bis zur stark alkalischen Reaktion einen dunkleren Farbenton an. Nach Beseitigung des Kalküberschusses durch Kohlensäure, Abfiltrierung des Calciumcarbonats und Verdunstung im Vakuum erhielt ich einen braunkirschroten Sirup, welcher bei längerem Stehen an der freien Luft sich trübte und auf der Oberfläche mit dunkel gefärbten Schuppen sich bedeckte.

Den dunklen Sirup fällte ich mit einer größeren Menge Alkohol, wobei ein amorpher, flockiger Niederschlag des Kalksalzes ausfiel, während der Alkohol eine blaßgelbe Färbung annahm. Nach dem Austrocknen des Kalksalzes erhielt ich etwas über 9 g desselben. Das Salz enthielt noch Chlor, aber keine Purinkörper, welche wahrscheinlich mit einem Teile des Harnfarbstoffes in dem Schwefelkupferniederschlage zurückgeblieben waren. Zu den Elementaranalysen wurde das Kalksalz chlorfrei gemacht und zwar durch mehrmals wiederholtes Auflösen desselben im Wasser und Ausfällen mit Alkohol.

Das Silbersalz: Zur Gewinnung des Silbersalzes benutzte ich ein aus einer größeren Menge Harn dargestelltes Präparat des Kalksalzes. Zu diesem Zwecke löste ich das



Kalksalz in einer geringen Wassermenge auf, fügte darauf soviel Silbernitrat in konzentrierter Lösung hinzu, als zur Fällung des gesamten in der Lösung enthaltenen Chlors notwendig war, filtrierte die Lösung vom Chlorsilber und versetzte das Filtrat solange mit Alkohol, als die Flüssigkeit sich noch trübte. Das chlorfreie Filtrat wurde mit einer konzentrierten Lösung vom Silbernitrat nunmehr im Überschuß versetzt, wobei ein reichlicher, amorpher, flockiger Niederschlag ausfiel. Aus diesem Niederschlag wurde das Kaliumnitrat zuerst mit 40%igem, darauf mit einem stärkeren und endlich mit 97%igem Alkohol ausgewaschen; schließlich wurde derselbe mit Äther nachgespült und über Schwefelsäure im Dunkel getrocknet. Die Menge des auf diese Weise gewonnenen Silbersalzes betrug annähernd den vierten Teil des verwendeten Kalksalzes.

Freies Urochrom. Die Schwierigkeit, eine größere Menge reinen Urochromsilbersalzes darzustellen, bildete ein wesentliches Hindernis der Bereitung der freien Verbindung aus dem Silbersalze. Zur Gewinnung einer freien Verbindung wurden daher Präparate des Kupferurochroms verwendet, welche aus reinen Kalksalzen von Säuren der Gruppe der Alloxyprotein-säure vermittelt Methode II (ohne Zufügung von  $\text{Ba}(\text{OH})$  und  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  zum Harn) dargestellt wurden, wie ich dies schon vorher beschrieben hatte. Die im Wasser suspendierte Kupferverbindung wurde mit Schwefelwasserstoff bei einer Temperatur von  $45\text{--}50^\circ \text{C}$ . zerlegt; das Filtrat vom Schwefelkupfer wurde im Vakuum bei  $40\text{--}45^\circ \text{C}$ . in einer  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre zur Sirupkonsistenz eingedampft. Den rotbraunen Sirup goß ich in 97%igen Alkohol ein, wobei ein ziemlich reichlicher flockiger Niederschlag entstand, welcher, wie es sich zeigte, eine bedeutende Menge Asche zurückließ. Die alkoholische Lösung von gesättigt gelber Färbung versetzte ich mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Äther, wobei ein reichlicher dunkelgelber, amorpher, flockiger Niederschlag ausfiel, während die alkoholisch-ätherische Lösung eine blaßgelbe Farbe annahm.

Der auf einem gehärteten Filter gesammelte Niederschlag wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und zu einem feinen Pulver zerrieben, welches nachher zu den Analysen ver-



wendet wurde. Die auf diese Weise aus 100 l Harn dargestellte Menge des freien Urochroms betrug 0,5–0,7 g. Alle zur Analyse bereiteten Präparate wurden zum konstanten Gewicht im Vakuum über Schwefelsäure in dem H. Meyerschen Apparate bei einer Temperatur von 50–55° C. getrocknet. Die Analyse dieser Präparate ergab folgende Prozentzahlen.

Tabelle I.

Kupferurochrompräparate, bereitet ohne Verwendung von Schwefelwasserstoff, nach der Methode Ia.

	1.	2.
	Prozent	Prozent
C =	—	36,76 <sup>1)</sup>
H =	—	3,56
N =	9,01	9,72
S =	1,81	2,57
Cu =	21,64	21,38

Tabelle II.

Kalk- und Silbersalz, dargestellt nach der Methode Ib.

Kalksalz		Silbersalz		Die Zusammensetzung der freien Säure, berechnet aus der Zusammensetzung des Silbersalzes C		
A	B	C <sup>2)</sup>				
Prozent	Prozent	Prozent			Prozent	
C	36,10	C	—	22,56; 22,66	C	44,75
H	4,41	H	—	2,45; 2,40	H	5,78
N	6,82	N	4,16	4,03	N	8,05
S	2,25	S	1,12; 1,13	1,35	S	2,25
Ca	13,99	Ag	52,08	50,06	O	39,17

<sup>1)</sup> Die Analyse, welche schon vorher in den Arbeiten über Protein-säuren angegeben wurde, l. c.

<sup>2)</sup> Silbersalz C wurde aus dem Kalksalze A bereitet.



## Tabelle III.

Freies Urochrom, nach der Methode II dargestellt.

	A	B
	Prozent	Prozent
C	45.32	43.42
H	5.26	5.33
N	9.49	10.78
S	5.59	5.89
O	34.34	34.58

Bei der Betrachtung der Resultate dieser Analysen (Tab. II und III) fiel uns hauptsächlich das starke Schwanken der Prozentzahl des Schwefels in den nach verschiedenen Methoden erhaltenen Präparaten auf. Wenn man nämlich den frischen oder konzentrierten Harn mit Baryt und Kalkmilch nach der Methode Ia und Ib verarbeitete, erwies sich die Prozentzahl des Schwefels in dem Kalk- und Silbersalze, sowie in der freien Säure, welche aus dem letzteren berechnet wurde, um die Hälfte kleiner gegenüber der Prozentzahl des Schwefels in jenen Präparaten der freien Säure, bei deren Darstellung ein Zusatz von Erdalkalien in überschüssiger Menge und die Bildung von freien Alkalien vermieden wurde (Methode II.)

### III. Die eigentliche (III.) Methode der Gewinnung von Urochrom.

Gestützt auf die Resultate der Elementaranalysen, die erwähnten analytischen Forschungen sowie auf die Erwägung, daß mittels der Methode II zwar reine, von Purinkörpern freie Präparate, von Salzen des Urochroms jedoch in geringer Ausbeute erhalten werden, habe ich eine weitere Änderung an der Methode der Darstellung des Urochroms unternommen.

Die neue Methode gründete ich nämlich auf die Beobachtung, daß Salze von Urochrom (Urochromkupfer) in Ammoniak gelöst werden können, ohne an ihrem Schwefelgehalt Einbuße zu erleiden. Ich habe deshalb behufs Entfernung der Schwefelsäure, der Phosphorsäure sowie der Harnsäure den Harn mit einer ammoniakalischen Lösung von Baryum- und



Calciumacetat gefällt. Zu 10 l Harn fügte ich nämlich eine Lösung von 86 g Calciumacetat, 53 g Baryumacetat und 43 cem 21%igen Ammoniak: nach mehrstündigem Stehen enthielt dann die Harnflüssigkeit weder Schwefelsäure noch Phosphorsäure und war auch beinahe frei von Harnsäure. Nach der Neutralisation des überschüssigen Ammoniaks mit Essigsäure wurde nun das Filtrat mit einer Lösung von Kupferacetat<sup>1)</sup> versetzt, deren saure Reaktion vorher mit Ammoniak abgestumpft worden war.

Bald zeigte sich ein amorpher, grünlichgrauer Niederschlag, welcher nach 24 Stunden auf einem Büchnerschen Filter gesammelt und sorgfältig mit Wasser ausgewaschen wurde.

Es wurden 100 l Normalharn auf diese Weise verarbeitet und zwar behufs Darstellung des Silbersalzes, welches zur Elementaranalyse verwendet werden sollte.

Zu diesem Zwecke zerteilte ich den Kupferniederschlag in Wasser, zerlegte ihn bei einer Temperatur von 50° C. mit Schwefelwasserstoff; nach Vertreibung des Schwefelwasserstoffs im Vakuum in einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre unter gelindem Erwärmen versetzte ich die gelblichrote Flüssigkeit mit einem kleinen Überschub einer Barytlösung. Es entstand ein gelber, flockiger Niederschlag, welcher abfiltriert wurde;<sup>2)</sup> der Barytüberschub im Filtrat wurde sofort mit Kohlensäure entfernt, die Flüssigkeit im Vakuum konzentriert und aus dem erhaltenen Sirup

<sup>1)</sup> Allerdings, da das Urochrom mit Kupferacetat wohl als Kupferoxydulsalz gefällt wurde und die notwendige Reduktion des Kupferacetats zu einer Kupferoxydulverbindung unzweifelhaft auf Kosten des Urochroms vor sich ging, welches dabei teilweise oxydiert werden mußte, lag es nahe an den Ersatz des Kupferacetats durch eines von den bekannten kupferoxydulhaltigen Reagentien zu denken. Da jedoch das frisch gefällte Kupferoxydulhydrat kein geeignetes Fällungsmittel war, das Krüger-Wulffsche Reagens (M. Krüger, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 351) das gefällte Urochrom mit anorganischen Schwefelverbindungen verunreinigte und die Balkesche Kupferhydroxylaminmischung wegen des Gehaltes an freiem Alkali nicht verwendet werden konnte, mußte ich doch an der Fällung mit Kupferacetat festhalten.

<sup>2)</sup> Die Barytlösung fällte einen Teil des Urochroms mit. Die Analyse dieses Niederschlages erwies nämlich darin 1,16% S und 27,6% Ba.



das Baryumurochromsalz vermittelt starken Alkohols in Form von amorphen Flocken gefällt.

Dieses Präparat (10 g) enthielt im trockenen Zustande 0,72 g auf NaCl berechneten Chlors. Zur Bereitung des Silbersalzes verwandelte ich das Baryumsalz nach dessen Auflösung in Wasser vermittelt einer schwachen Natriumsulfatlösung in ein Natriumsalz, wobei ich von diesem Reagens soviel zusetzte, damit in der Lösung eher eine Spur von Baryumsalz als ein kleiner Überschuß vom Natriumsulfat verbleibe; dann fällte ich nach Konzentrierung der Lösung im Vakuum das Chlor mit Silbernitrat und versetzte das Filtrat vom Silberchlorid mit Alkohol und einem Überschuß einer konzentrierten Silbernitratlösung. Das Silbersalz wusch ich, wie oben erwähnt, zuerst mit schwachem Alkohol und, als die Waschflüssigkeit die Reaktion auf Nitrate nicht mehr gab, mit starkem Alkohol und Äther. Schließlich wurde das Präparat zur Elementaranalyse getrocknet. Das Resultat dieser Analyse ist aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle IV.

Silbersalz		Freie Säure, aus dem Silbersalz berechnet	
	Prozent		Prozent
C	24,60	C	42,76
H	2,85	H	4,96
N	6,63	N	11,53
S	2,47	S	4,29
Ag	42,86	O	36,47

Bei der Betrachtung der jetzt gefundenen Zusammensetzung des Silbersalzes und beim Vergleich mit den Zahlen, welche früher bei der Analyse von nach einer anderen Methode bereiteten Präparate dieses Salzes erhalten wurden (Tabelle II), fiel eine nicht geringe Abweichung des jetzt gefundenen Silbergehaltes, sowie auch ein größerer Schwefelgehalt des jetzt erhaltenen Präparates auf, was offenbar darauf beruht, daß das früher erhaltene Silbersalz den Farbstoff in nicht ganz



intaktem Zustand enthielt. Die Zunahme des Silbergehaltes schien nämlich mit der Abnahme des Schwefelgehaltes parallel zu gehen. Dagegen lassen die aus der Zusammensetzung des jetzt erhaltenen Silbersalzes für den freien Farbstoff berechneten Werte eine ziemlich gute Übereinstimmung mit der direkt gefundenen Zusammensetzung von Präparaten des freien Farbstoffs, welche nach der Methode II dargestellt worden waren (Tabelle III), erblicken, woraus geschlossen werden kann, daß diese Zahlen resp. die aus denselben berechneten Mittelwerte, welche ich in einer besonderen Tabelle (V) zusammengestellt folgen lasse, die Zusammensetzung des Farbstoffs annähernd richtig ausdrücken.

Tabelle V.

Die Zusammensetzung des freien Urochroms.

	1.	2.	3.
	Präparat B (aus Tabelle III)	Zusammensetzung berechnet aus dem Silbersalz	Mittlere Zusammensetzung
	Prozent	Prozent	Prozent
C	43.42	42.76	43.09
H	5.33	4.96	5.14
N	10.78	11.53	11.15
S	5.89	4.29	5.09
O	34.58	36.47	35.53

Es wäre selbstverständlich verfrüht, aus diesen Werten eine Formel für das Urochrom abzuleiten. Eine gewisse Vorsicht ist diesbezüglich durch die große Unbeständigkeit des Urochroms, welche ja nicht nur von mir beobachtet, sondern auch von anderen Autoren, von Proust an bis Garrod betont wurde, geboten. Es bedürfte ferner dazu einer größeren Zahl von Analysen von Präparaten verschiedener Darstellung, was mit Rücksicht auf die Schwierigkeit der Gewinnung des Urochroms weiteren Untersuchungen vorbehalten werden muß.

#### IV. Eigenschaften des Harnfarbstoffes.

Das Urochrom hat die Eigenschaften einer Säure, es färbt das blaue Lackmuspapier stark rot: es gibt ähnlich wie die



Proteinsäuren ein in Wasser leicht, in Alkohol dagegen unlösliches Baryum- und Natriumsalz, sowie auch ein Silbersalz. Diese Salze sind amorph, wie auch die Kupferoxydulverbindung, welche aus einer sauren oder neutralen Lösung des Urochroms mit Kupferacetat gefällt wird.

Außer durch das Kupferacetat wird das Urochrom aus den Lösungen durch basisches Bleiacetat und Quecksilberacetat gefällt. Eine frische Eisenchloridlösung fällt aus den Urochromsalzlösungen einen bräunlichen flockigen Niederschlag. Die Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure geben in den Urochromlösungen reichliche Niederschläge, welche sich jedoch beim Waschen mit stark verdünnten Säuren leicht auflösen. Jodjodkaliumlösung (Bouchardats Reagens), sowie das Jodquecksilberkaliumjodid geben mit Urochromlösungen keinen Niederschlag. Quecksilberchlorid fällt aus wässerigen Lösungen von freiem Urochrom fast gar keinen Niederschlag aus, in einer Alkohollösung des Farbstoffs gibt dagegen eine alkoholische Quecksilberchloridlösung einen reichlichen flockigen Niederschlag. Aus den wässerigen und alkoholischen Lösungen fallen Gold- und Platinchlorid das Urochrom nicht.

Ebenso amorph wie seine Metallverbindungen ist auch der freie Farbstoff, welcher im trockenen Zustand nach dem Zerreiben das Aussehen eines dunkelgelben Pulvers hat. Im 90%igen Alkohol löst sich das frisch gewonnene Urochrom leichter auf als das getrocknete Präparat, wobei es der Lösung eine schöne goldgelbe Farbe erteilt; im absoluten Alkohol löst es sich schwer auf. Die alkoholische Lösung läßt sich ohne Änderung aufbewahren. Äther fällt aus dieser Lösung einen leichten flockigen Farbstoffniederschlag. Gleich wie Äther, lösen Benzol, Essigäther und Chloroform das freie Urochrom nicht auf. Bei Verbrennung des Farbstoffs auf einem Platinblech entsteht in reichlicher Menge ein Kohlenschwamm.

Auf Zusatz von Mineralsäuren bei Zimmertemperatur änderten die goldgelben Lösungen des Urochroms ihre Farbe nicht, beim Erwärmen aber nahmen sie eine rotbraune Farbe an. Durch Ammoniak wird die Farbe der in Wasser gelösten reinen Urochrompräparate nicht geändert. Auch durch Kali-



oder Natronlauge erleiden diese Lösungen keine sichtbare Farbenänderung. Tatsächlich jedoch spalten die Laugen schon bei Zimmertemperatur den im Urochrommolekül locker gebundenen Schwefel ab. Davon kann man sich überzeugen, wenn man zu einer Urochromlösung Bleiacetat und Natronlauge fügt, wobei Bleisulfid ausgeschieden wird, dessen Menge sich beim Erwärmen der Flüssigkeit noch steigert. Die wässrigen Urochromlösungen geben mit Natronlauge und Nitroprussidnatrium eine purpurrote Färbung, welche rasch verblaßt und in Braunrot übergeht, um dann zu verschwinden, also eine ähnliche Reaktion, welche unter diesen Umständen am Cystein sich beobachten läßt.<sup>1)</sup>

Das Urochrom zeichnet sich durch eine ungewöhnlich große Zersetzlichkeit aus.

Wenn zu einer schwachen, mit einer verdünnten Ferricyankalilösung vermischten Eisenchloridlösung (Selmis Reagens) freies Urochrom hinzugefügt wird, schlägt die blaßgelbe Farbe der Mischung sogleich in eine intensiv himmelblaue um, wobei sich ein Niederschlag von Berlinerblau ausscheidet. Jodsäure wird unter dem Einflusse des Urochroms zu Jodwasserstoff reduziert, hierbei wird Jod ausgeschieden, welches man der Lösung mit Leichtigkeit mit Schwefelkohlenstoff entziehen kann. Keine von den Proteinsäuren gibt diese Reaktion. Goldchlorid wird jedoch von Urochrom beim Erwärmen nicht reduziert, und ebenso gibt eine ammoniakalische Silberlösung mit dem Urochrom keinen Metallspiegel.

Bei der Spektralanalyse zeigen weder die sauren noch die alkalischen goldgelben Lösungen des Urochroms einen Absorptionsstreifen. Mit Zinkchlorid und Ammoniak fluorescieren diese Lösungen nicht. Zahlreiche in dieser Richtung mit verschiedenen, bald aus normalem, bald aus pathologischem Harn bereiteten Farbstoffpräparaten ausgeführte Versuche haben dies Verhalten des Urochroms im Spektroskop unwiderleglich dargetan. Schon schwachen Urochromlösungen ist eine starke Absorption der violetten Strahlen des Spektrums eigen. Wenn wir zu Vergleichszwecken die Spektren von Urobilin und Urochrom in mög-

<sup>1)</sup> K. A. H. Mörner, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 611.



lichst gleicher Konzentration übereinander untersuchen, so zeigt sich, daß in dem Spektrum des Urobilins die blauen Strahlen an jener Stelle sichtbar sind, an welchen sie im Spektrum des Urochroms der Absorption unterliegen. Die Intensität der Absorption hängt von der Konzentration der Urochromlösungen ab. Aus den zahlreichen spektroskopischen Untersuchungen ergab sich, daß der Beginn der Absorption in konzentrierten Lösungen der mittleren Wellenlänge von  $\lambda\lambda$  470—468, dagegen in den verdünnten Lösungen der Wellenlänge  $\lambda\lambda$  444—442 entsprach.

Zur Kennzeichnung des Urochroms mag ferner erwähnt werden, daß durch Umsetzung seines Silbersalzes mit Methyljodid eine esterartige Verbindung des Urochroms erhalten wurde. Beim Vermischen des Silberurochroms mit einem geringen Überschuß von Methyljodid trat die Reaktion zwischen diesen Körpern bereits bei Zimmertemperatur ein. Das Reaktionsprodukt war in Äther und Benzol unlöslich, schwer löslich in Chloroform, leicht löslich dagegen in Methylalkohol; es wurde daher von Jodsilber durch Auflösen in Methylalkohol getrennt. Die methylalkoholische Lösung hinterließ nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in vacuo eine dunkelgelb gefärbte harzige Masse, welche im Exsikkator erstarrte und sich dann zu einem Pulver zerreiben ließ. Dieses Esterifikationsprodukt war frei von Jod, enthielt Schwefel und gab in methylalkoholischer Lösung mit Kupferacetat eine in Wasser unlösliche Kupferverbindung.

## V. Versuche der Spaltung des Urochroms.

### 1. Pyrrol als Spaltungsprodukt des Urochroms.

R. Maly,<sup>1)</sup> A. Riva,<sup>2)</sup> P. Chiodera<sup>3)</sup> und A. Garrod,<sup>4)</sup> welche sich mit der Untersuchung des spezifischen Farbstoffs des Harns befaßt hatten, waren der Ansicht, daß zwischen demselben und dem Blutfarbstoff ein naher Zusammenhang

<sup>1)</sup> Liebigs Ann., Bd. CLXIII, S. 90 (1872).

<sup>2)</sup> Gaz. med. di Torino, Vol. XLVII, Nr. 12 (1896).

<sup>3)</sup> Archiv. Ital. di Clin. Med., Bd. XXXV, S. 505 (1896).

<sup>4)</sup> Journal of physiology, Bd. XXI, S. 196 (1897), und Bd. XXIX, S. 335 (1903)



bestehe. In seinen Schlußfolgerungen betrachtet Garrod das Urochrom als gewissermaßen verändertes Urobilin; Urobilin könne unter geeigneten Bedingungen, z. B. durch Behandlung mit Äther auf dem Wasserbade, unter Verlust des charakteristischen Absorptionsbandes am Spektrum, in Urochrom verwandelt werden. Das Urobilinband soll aber wieder an seinem ursprünglichen Ort erscheinen, wenn man das Urochrom mit im Lichte abgestandenem Aldehyd behandelt.

Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, bin ich von der Erwägung ausgegangen, daß, wenn das Urochrom ein Produkt der Umwandlung des Urobilins wäre, oder diesem Farbstoff überhaupt nahe stände, so müßte es ein Derivat des Blutfarbstoffs, resp. des Hämochromogens sein und folglich ähnlich wie alle nächsten farbigen Umwandlungsprodukte derselben in den Versuchen von M. Nencki und J. Zaleski,<sup>1)</sup> und wie das Chromogen des Chlorophylls in dem Versuche von Nencki und Marchlewski,<sup>2)</sup> Hämopyrrol leicht abspalten lassen.

Daß das Urochrom in der Tat einen pyrrolartigen Körper leicht abspalten läßt, hatte mich eine Vorprüfung sofort belehrt.

Das beim Erhitzen des getrockneten Kupferurochroms mit Zinkstaub erhaltene Destillat wies nämlich den eigentümlichen Geruch des Pyrrols auf und gab mit einem Fichtenholzspahn eine intensive Reaktion auf Pyrrol. Es blieb nur noch zu entscheiden, ob der sich abspaltende pyrrolartige Körper Hämopyrrol oder eine andere, der Pyrrolgruppe zugehörige Verbindung war.

Zur Entscheidung dieser Frage versuchte ich anfangs durch Reduktion des Urochroms mit Jodwasserstoff und Phosphoniumjodid und zwar genau nach dem Vorgehen von Nencki und Zaleski zu gelangen.

3 g Urochromkupfer wurden zu dem Zweck mit 75 ccm Eisessig und 100 g Jodwasserstoff auf dem Wasserbade erwärmt. Nach 20–25 Minuten wurden zu der erhaltenen Lösung

<sup>1)</sup> M. Nencki, Opera omnia, Bd. II, S. 797.

<sup>2)</sup> M. Nencki, Opera omnia, Bd. II, S. 804, und Rozprawy akademji umiejętności (Krakau), Bd. XLI, S. 333.



nach und nach in kleinen Mengen 10 g Phosphoniumjodid zugefügt. Die Lösung nahm eine blaßgelbe Farbe an. Nach halbstündigem Erhitzen versetzte ich die Flüssigkeit mit dem dreifachen Volumen Wasser; hierbei trübte sich die Flüssigkeit und schied einen gelben flockigen Niederschlag aus. Nach dem Abfiltrieren desselben wurde zu dem Filtrat Natriumhydroxyd in einer zur Neutralisation der Jodwasserstoffsäure und des größten Teiles der Essigsäure genügenden Menge zugefügt, oder man übersättigte dasselbe direkt mit Lauge (wie dies in einem anderen Versuche getan wurde) und unterwarf die Flüssigkeit sofort der Destillation. Das erhaltene Destillat enthielt nicht die charakteristischen öligen Tropfen des Hämopyrrols, welche bei der Reduktion des Hämins nach der vorerwähnten Methode leicht erhalten werden konnten, und gab mit Quecksilberchlorid und Pikrinsäure keinen Niederschlag. Der Ätherauszug des Destillats gab mit Benzaldehyd oder Formaldehyd beim Zusatz von mit HCl gesättigtem Alkohol keine für Hämopyrrol charakteristischen gefärbten Kondensationsprodukte. Nach dem Abdampfen des Äthers zeigte der unbedeutende Rückstand nach Zusatz von verdünnter Salzsäure und einige Tage langem Stehen an der Luft eine kaum merkbare rosenrote Färbung. Bei dreimaliger Wiederholung dieses Reduktionsversuches mit verschiedenen Urochromkupferpräparaten wurden stets die gleichen negativen Ergebnisse hinsichtlich des Hämopyrrols erhalten.

Es erübrigte nun noch, den pyrrolartigen Körper, welcher bei der trockenen Destillation des Urochroms sich bildete, einer Untersuchung auf etwaige Identität mit Hämopyrrol zu unterwerfen. Da die trockene Destillation des Urochromkupfers mit Zink zu Zweifeln Anlaß geben könnte, ob das dabei etwa entstandene Pyrrol nicht einer sekundären, synthetischen Reaktion seine Bildung verdanke, so habe ich versucht, ob die Erdalkalisalze des Urochroms nicht etwa direkt beim Erhitzen den pyrrolartigen Körper abspalten. Dies war in der Tat der Fall. Sowohl das Kalksalz des Urochroms wie das Urochromkupfer nach dem Vermischen mit gebranntem Kalk entwickelten bereits beim gelinden Erwärmen reichliche Dämpfe der uns interessierenden Verbindung.



Den Versuch führte ich in folgender Weise durch: 3—4 g der Urochromkupferverbindung wurden mit der gleichen Menge Calciumoxyd sorgfältig vermengt und in ein an einem Ende zugeschmolzenes Glasrohr eingeführt, dessen anderes Ende mit einer U-förmigen, mit 2 kugelförmigen Erweiterungen versehenen Röhre verbunden wurde. Der Apparat wurde nun luftleer gemacht und ein Teil des U-Rohres stark abgekühlt. Hierauf wurde das mit der Substanz beschickte Rohr mit einer Gasflamme leicht erwärmt. Es destillierte in die Vorlage eine dichte gelbe Flüssigkeit, welche in dem abgekühlten Teil derselben zu einem festen Körper erstarrte. Nach der Beendigung der Destillation wurde das U-Rohr abgeschnitten, und das Ammoniak aus demselben *in vacuo* verjagt. In dem nun zurückgebliebenen wässerigen Rückstand konnte man einige Tropfen einer öligen, gelben Flüssigkeit bemerken, welche den Geruch des schmierigen Inhalts einer Tabakspfeife hatte.

Um über die Natur der im Destillat erhaltenen pyrrolartigen Verbindung Aufklärung zu erlangen, habe ich mich des eigentümlichen Verhaltens des Pyrrols und seiner Homologe gegenüber dem Diazobenzolchlorid bedient.

Nach Otto Fischer und Hepp<sup>1)</sup> geben Diazosalze mit Pyrrol und seinen Homologen, wenn auch dieselben in saurer Lösung reagieren, normale Azofarbstoffe, in alkalischer Lösung dagegen entweder nur Disazoverbindungen oder Gemengen von Azo- und Disazokörpern. Das Hämopyrrol stellt nun nach L. Marchlewski und seinen Mitarbeitern<sup>2)</sup> eine Ausnahme von dieser Regel dar, indem es mit Diazobenzolchlorid bereits in saurer Lösung eine Disazoverbindung lieferte.

Die Azofarbstoffe kann man aber bekanntlich auf Grund ihres verschiedenen Verhaltens Säuren und Laugen gegenüber unterscheiden.

Behufs Prüfung auf Hämopyrrol wurde nun das erhaltene Destillat mit Kalilauge übersättigt und mit Äther ausgezogen.

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 2251.

<sup>2)</sup> H. Goldmann, J. Hetper, L. Marchlewski, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 176.



Der ätherische Auszug, welcher eine gelbe Farbe hatte, wurde in drei Teile geteilt.

A. Der erste Anteil wurde in einem Reagenzröhrchen zur Trockene verdampft, der Rückstand entwickelte nach der Erhitzung Pyrroldämpfe, welche einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenholzspahn intensiv färbten.

B. Der zweite Teil der ätherischen Lösung wurde mit einer frisch bereiteten Lösung von Diazobenzolchlorid<sup>1)</sup> versetzt und damit geschüttelt. Die Ätherschichte färbte sich orange-gelb, während das Hämopyrrol unter denselben Bedingungen sofort eine rotbraune, nach und nach in violettbraun übergehende Färbung gibt.

C. Der dritte Teil der ätherischen Lösung wurde auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand in einer geringen Alkoholmenge aufgelöst, hierzu die 15—20fache Menge verdünnter Natronlauge zugesetzt und die Mischung in Eis stark abgekühlt.<sup>2)</sup>

Die kalte, alkalische Lösung nahm, mit Diazobenzolchlorid versetzt, eine schöne rote Farbe an und begann nach einigen Augenblicken einen während des Schüttelns derselben sich noch vermehrenden roten, amorphen, flockigen Niederschlag von Disazofarbstoff auszuscheiden. Dieser Farbstoff löste sich in Wasser und Äther gar nicht, in kaltem Alkohol schwierig, in Benzol leicht auf.

Konzentrierte Schwefelsäure löste den Farbstoff mit schön himmelblauer Farbe auf; aus der Lösung fielen nach der Verdünnung mit Wasser ziegelrote Flocken aus.

Salzsäure gab eine purpurrote Lösung, welche später einen veilchenblauen Farbenton erhielt. Die alkoholische Lösung der Disazoverbindung gab mit Kalilauge eine schöne, fuchsinrote Färbung.

Unter Einwirkung einer alkoholischen Zinkacetatlösung gab die alkoholische Lösung des Disazofarbstoffes keine Metall-

<sup>1)</sup> 100 ccm  $\frac{1}{5}$ -N.-Anilinchlorhydratlösung wurden mit 2.4—3 g Salzsäure von 1,19 spez. Gew. und nach Abkühlung der Mischung mit Eis mit 2 g Kaliumnitrit versetzt. (Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXI, S. 1698.)

<sup>2)</sup> O. Fischer und E. Hepp, l. c.



verbindungen, welche sich durch Farbenwechsel differenzieren ließen, wie dies beim Disazohämopyrrol stattfindet.

Die spektroskopische Untersuchung der Lösung des Disazofarbstoffs ließ keine charakteristischen Absorptionsstreifen erkennen.

Aus den mitgeteilten Versuchen ist klar zu ersehen, daß die Pyrrolgruppe im Urochrom kein Hämopyrrol ist, daß sie sich gegen die Diazoverbindungen der Benzolreihe wie das von O. Fischer und E. Hepp untersuchte Pyrrol und dessen Alkylderivate verhält.

Näheres über die chemische Natur dieses im Molekül des Harnfarbstoffs enthaltenen Pyrrolringes versuchte ich ferner mit Hilfe der spektroskopischen Untersuchung eines etwaigen aus dem Destillate zu erhaltenen Kondensationsproduktes zu erfahren. Um darüber Untersuchungen anzustellen, unterwarf ich einige Gramme des Urochromkupfersalzes der trockenen Destillation mit Kalk in der oben beschriebenen Weise: löste das ölige Destillat in Alkohol, fällte die alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid, sammelte den flockigen Niederschlag auf dem Filter, wusch ihn mit Wasser aus und unterwarf ihn nach dem Trocknen und Vermengen mit Kalk noch einer Destillation. Das jetzt erhaltene Destillat wurde im alkoholhaltigen Äther gelöst und mit Salzsäure gesättigtem Alkohol angesäuert.

Schon am nächsten Tage nahm die Flüssigkeit die rosa-rote Farbe des Pyrrolrot an.

Dasselbe Resultat wurde übrigens auch erhalten, als der gleichen Behandlung die ölige Flüssigkeit unterworfen wurde, welche durch trockene Destillation des Kupferurochroms mit Kalk direkt gewonnen worden war.

Bei der spektroskopischen Untersuchung gab die saure alkoholische Lösung kein Absorptionsband, dagegen erhielt ich nach der Bindung der Säure mit einem kleinen Überschuß von Ammoniak und Hinzufügen einiger Tropfen einer alkoholischen Zinkacetatlösung eine schwache Fluorescenz der Flüssigkeit, deren Spektrum diesmal einen deutlich abgegrenzten Absorptionsstreifen zeigte.



Die Lage dieses Streifens, bei möglichst gleicher Konzentration der Lösung, wurde durch die folgenden Wellenlängen bestimmt:

1.  $\lambda$  501 —  $\lambda$  483 (Pyrrol aus der Quecksilberverbindung).
2.  $\lambda$  500 —  $\lambda$  485 (Pyrrol aus der Kupferverbindung).

Eine ähnliche Lage des Streifens in der ammoniakalischen Zinklösung zeigt das polymerisierte Pyrrol, worauf J. Zaleski<sup>1)</sup> aufmerksam machte. Ich wiederholte den Versuch von Zaleski.

Ich ließ nämlich eine alkoholische Pyrrolösung, welche ich mit einigen Tropfen Salzsäure versetzte, durch 4 Wochen bei freiem Luftzutritt stehen, worauf die Flüssigkeit eine braungelbe Farbe annahm. Nach Hinzufügung einer ammoniakalischen, alkoholischen Zinkchloridlösung zeigte die Flüssigkeit in der Tat eine grüne Fluorescenz und das Spektrum derselben einen Absorptionsstreifen, dessen Lage ich mittels nachstehender Wellenlängen bestimmt fand.

$$\lambda 500 \text{ — } \lambda 478.$$

Um die Lage der Absorptionsstreifen in den alkoholisch-ammoniakalischen Lösungen der Zinkverbindungen, der in Urochrom enthaltenen Pyrrolgruppe und des polymerisierten Pyrrols einerseits, des Hämopyrrolurobilins sowie des aus einem Fieberharn hergestellten Urobilins andererseits zu vergleichen, habe ich eine Reihe spektroskopischer Messungen an ihren Spektren ausgeführt. Um das Hämopyrrol in Urobilin überzuführen, wurde dasselbe in einer alkoholischen, mit Salzsäure versetzten Lösung durch zwei Monate stehen gelassen: Urobilin wurde aus dem Harn von Fiebernden (appendicitis, pneumonia crouposa und meningitis tuberculosa) entweder durch Fällung mit Ammoniumsulfat (Methode von Garrod und Hopkins) oder durch Schütteln mit Chloroform (Methode von Wirsing)<sup>2)</sup> gewonnen.

Die alkoholischen Farbstofflösungen von möglichst gleicher Konzentration wurden mit einer ammoniakalischen Zinkchloridlösung versetzt.

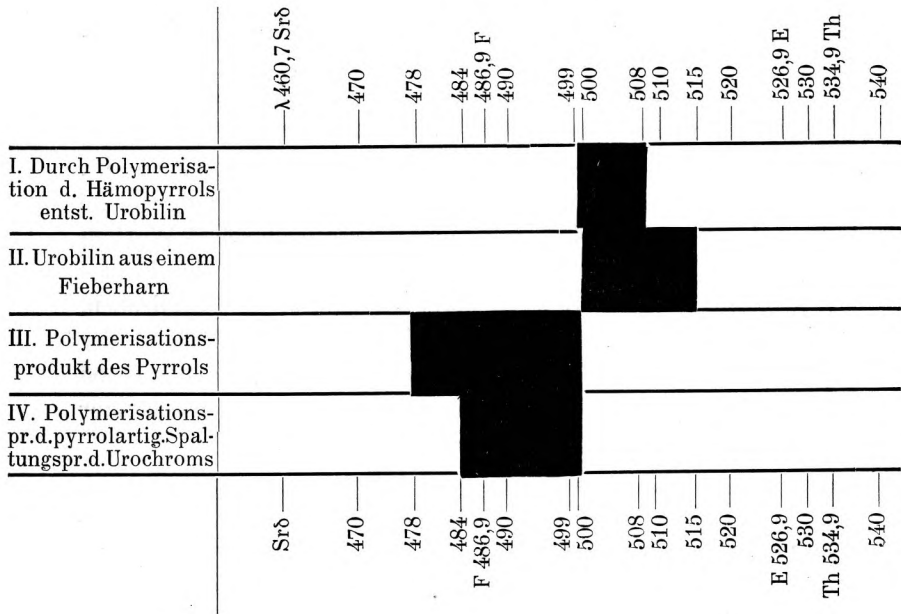
Auf der beiliegenden Tafel wurden diese Spektren unter

<sup>1)</sup> J. f. Th., Bd. XXXV, S. 404 (1905).

<sup>2)</sup> Huppert, Analyse des Harns, 10. Auflage, S. 528 und 533.



Zugrundelegen der mittleren Wellenlängen, welche aus zahlreichen Messungen berechnet worden waren, abgebildet.



Ein Blick auf diese Tafel wird jedermann überzeugen, daß der aus dem Urochrom entstandene Pyrrolkörper dasselbe Spektrum liefert wie das gewöhnliche Pyrrol und daß dieses Spektrum von den Spektren sowohl des Hämopyrrolurobilins wie des Harnurobilins verschieden ist.

Schon auf Grund dieses Verhaltens der untersuchten Verbindung im Spektroskop muß die Möglichkeit einer Umwandlung von Urobilin in Urochrom oder umgekehrt, wie dies aus den Untersuchungen italienischer und englischer Autoren gefolgert werden könnte, ausgeschlossen werden.

## 2. Über die Art der Bindung des Schwefels in Urochrom.

Daß der Schwefel des Urochroms durch Mineralsäuren in der Wärme, durch Laugen sogar bei Zimmertemperatur sich اسپalten ließ, wurde in der vorläufigen Mitteilung über das



Urochrom bereits erwähnt. Nun unternahm ich die Art der Bindung des Schwefels quantitativ zu untersuchen.

Zu dem Zwecke wurden 180 l Harn nach der Vorbehandlung nach der Methode Ib mit Kupferacetat gefällt. Die Ausbeute an dem Kupferniederschlag, welcher außer Kupferurochrom noch Kupferverbindungen der Purinkörper und Kupferchlorür enthielt, betrug nach dem Trocknen desselben 37 g. Sein Gesamtstickstoff — 15,2%, der Stickstoff der darin enthaltenen Purinkörper — 5,535%.<sup>1)</sup> In diesem Kupferniederschlag wurde nun der Gesamtschwefel durch Schmelzen mit Kalihydrat und Salpeter, der als Sulfid abspaltbare Schwefel nach der Methode von K. A. H. Mörner,<sup>2)</sup> die Ätherschwefelsäure durch Erwärmen mit Salzsäure unter Zusatz von Zinnchlorür<sup>3)</sup> bestimmt.

Gesamt-S in Prozenten	Als Sulfid abspaltbarer S		Als Ätherschwefelsäure abspaltbarer S	
	absolut in Prozenten	in Prozenten des Gesamt-S	absolut in Prozenten	in Prozenten des Gesamt-S
3,575	2,17	60,7	0,361	10

60,7% des Gesamtschwefels ließen sich also in dem Urochromkupferniederschlag durch Erwärmen mit Kalilauge als Sulfid abspalten und nur 10% wurden darin in oxydierter als Schwefelsäure abspaltbarer Form<sup>4)</sup> gefunden.

<sup>1)</sup> Derselbe wurde nach einer Methode ermittelt, welche in einer demnächst zu erscheinenden Veröffentlichung beschrieben wird.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 210.

<sup>3)</sup> Vide: Bondzyński, Dombrowski und Panek, l. c.

<sup>4)</sup> Daß dieser Schwefel im intakten Harnfarbstoff wirklich in der Form von Ätherschwefelsäure enthalten wäre, ist kaum möglich. Bei dieser Annahme müßte man schließen, daß das Molekül des Urochroms um das vielfache größer wäre, als dasjenige von den meisten Eiweißkörpern, und daß in ihm wenigstens 10 Atome Schwefel enthalten wären. Es ist im Gegenteil viel mehr wahrscheinlich und es spricht dafür auch die hohe Oxydierbarkeit des Urochroms, daß die geringe Menge Schwefelsäure, welche bei der Hydrolyse des Urochroms als solche abgespalten wurde, einer in vitro stattgefundenen Oxydation des einen Teils des Schwefels des Urochroms seinen Ursprung zu verdanken hat. Eine solche Oxydation könnte während der Hydrolyse oder noch früher während der Fällung des Urochroms und zwar gerade durch das Kupferacetat selbst



Durch dieses Resultat wurde die Frage angeregt, was für eine Gruppe im Urochrommolekül der Träger des als Sulfid reichlich abspaltbaren Schwefels wäre. Es lag selbstverständlich nahe, mit Rücksicht auf die nahe genetische Beziehung des Urochroms zu den Eiweißstoffen hier an das Cystin resp. das Cystein zu denken. Die in den Eiweißstoffen enthaltene Cystingruppe läßt nach K. A. H. Mörner beim Erwärmen mit Bleihydroxyd in alkalischer Lösung nicht die ganze Menge ihres Schwefels, sondern nur 75<sup>0</sup>/<sub>100</sub> davon als Sulfid abspalten. Beim Übertragen dieser Resultate auf das Urochrom würde an der Hand dieser Berechnung der Cystinschwefel des Urochroms in dem soeben beschriebenen Versuch zu 2,89<sup>0</sup>/<sub>100</sub> ( $2,17 \times \frac{4}{3}$ ), also zu 80,8<sup>0</sup>/<sub>100</sub> des Gesamtschwefels, oder nach dem Subtrahieren von dem Gesamtschwefel des in der Form von Schwefelsäure abspaltbaren zu 89,8<sup>0</sup>/<sub>100</sub> des neutralen Schwefels des Urochroms sich berechnen.

Wäre dieser bleischwärende Schwefel wirklich Cystinschwefel, so müßte bei einer Spaltung des Urochroms mit Mineralsäuren das Cystin sich abspalten und darstellen lassen. Ich möchte hier gleich im voraus bemerken, daß ein solcher Spaltungsversuch ausgeführt wurde, daß das Cystin unter den Spaltungsprodukten nicht gefunden, daß jedoch bei dieser Hydrolyse ein schwarzer melaninartiger Körper erhalten wurde. Diese Spaltung wurde ebenfalls an einem Material ausgeführt, welches aus dem rohen, nach der Methode I bereiteten Urochromkupfer gewonnen wurde. Der aus 100 l Harn erhaltene Kupferniederschlag wurde zu dem Zweck mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat in vacuo im Kohlensäurestrom eingeengt und auf 500 ccm verdünnt. Nach der Bestimmung in einer besonderen Probe des gesamten sowie des bleischwärenden Schwefels wurde nun die erhaltene dunkelkirschrote, mit einer

stattfinden. In der Tat, es spricht z. B. für diese Vermutung die Beobachtung, daß der aus dem Filtrat von dem soeben analysierten Kupferurochrom in der Wärme gefällte Kupferniederschlag bedeutend weniger Schwefel in der als Sulfid abspaltbaren Form enthielt und zwar nur 0,638<sup>0</sup>/<sub>100</sub> von 2,44<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, also bloß 26<sup>0</sup>/<sub>100</sub> des Gesamtschwefels, sowie auch die Beobachtung, daß das Urochrom einen Teil seines Schwefels mit Salpetersäure bereits in der Kälte zu Schwefelsäure oxydieren läßt.



Nuance ins braun gefärbte Lösung in einen Kolben gebracht, welcher mit einem doppelt durchbohrten Kork verschlossen wurde, in dem zwei Glasröhrchen befestigt worden waren; eines von den Glasröhrchen, welches ungebogen war, diente nach der Einführung von Quecksilber als Quecksilberventil, durch das andere wurden die bei der Zersetzung des Urochroms entstandenen Gase abgeleitet und einer Waschflasche, welche eine Lösung von Bleiacetat enthielt, zugeführt. Die Lösung des Farbstoffs (470 ccm) wurde jetzt mit 56 ccm konzentrierter Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,185) versetzt und 7 Tage damit auf dem Wasserbade (auf 90—94°) erwärmt. Die Flüssigkeit wurde dadurch dunkelbraun gefärbt und enthielt in Suspension einen schwarzen, flockigen Niederschlag sowie freien Schwefel, welcher besonders am Halse des Kolbens sich in Schuppen abgesetzt hatte. Von diesem Niederschlag wurde abfiltriert. Außer dem Schwefelwasserstoff, welcher in der Waschflasche als Bleisulfid zurückgehalten und auf diese Weise bestimmt werden konnte, wurde die bei der Hydrolyse entstandene Kohlensäure und zwar im Filtrate vom schwarzen Niederschlag, sowie auch der Schwefel der melaninartigen Substanz bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmungen sind aus der Tabelle (VI) ersichtlich.

Tabelle VI.

Schwefel in der gesamten Flüssigkeitsmenge, 470 ccm.

Gesamt-schwefel	Locker gebundener, bleischwärender Schwefel	Schwefel in Form v. Ätherschwefelsäure	Als H <sub>2</sub> S flüchtiger Schwefel	Schwefel in dem schwarzen Niederschlag
0,4685	0,2138	0,0697	0,0084	0,0567
100%	45,6%	14,57%	1,75%	11,85%

Der Gehalt an bleischwärendem Schwefel wurde diesmal etwas geringer gefunden als in dem ersten Versuche, was wohl die Folge einer etwaigen Wirkung des freien Alkali auf den Harnfarbstoff bei der Darstellung des Urochromkupfers nach einer Methode, welche nach späteren Erfahrungen eben aus dem Grunde verlassen wurde, sein könnte. Der Gehalt an der



Ätherschwefelsäure dagegen und zwar wahrscheinlich weil die Hydrolyse diesmal mit Ausschluß von Zinnchlorür ausgeführt worden war, wurde etwas höher gefunden.

Zur Untersuchung auf Cystin wurde die Flüssigkeit nach der Trennung von der melaninartigen Substanz sowie von Baryumsulfat mit Tierkohle entfärbt und in vacuo eingeeengt; der erhaltene Rückstand wurde mit 70%igem Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug mit Kalilauge bis zur schwachen alkalischen Reaktion versetzt und darauf mit Essigsäure angesäuert.

Es entstand ein flockiger Niederschlag, welcher auf dem Filter gesammelt wurde. Derselbe enthielt nur wenig Schwefel und seine ammoniakalische Lösung schied auch nach dem Verdunsten von Ammoniak kein Cystin aus. Da das Filtrat von diesem Niederschlag bleischwärenden Schwefel in reichlicher Menge enthielt und mit Nitroprussidnatrium die dem Cystein eigene Farbenreaktion auch gab, so wurde dasselbe mit Quecksilberacetat unter Neutralisation mit Soda gefällt. Es entstand ein reichlicher Niederschlag, in welchem jedoch das Cystein (durch Überführung in Cystin) nicht nachgewiesen werden konnte.

### 3. Uromelanin als Spaltungsprodukt des Urochroms.

In weiterer Verfolgung der schwefelhaltigen Spaltungsprodukte des Urochroms unter vorläufigem Verzicht auf die Untersuchung der löslichen Spaltungsprodukte wandte ich mich der Erforschung des melaninartigen Körpers zu.

Als Material zu dieser Untersuchung diente wiederum ein rohes Präparat des Kupferurochroms, welches diesmal aus 200 l Harn nach der Methode III erhalten wurde. Nach dem Zerlegen des Kupferniederschlages mit Schwefelwasserstoff, Austreiben des letzteren mit einem Luftstrom, Einengen der Flüssigkeit in vacuo verfuhr ich mit der erhaltenen konzentrierten Lösung des Farbstoffs ähnlich wie Nencki mit den melanotischen Geschwülsten, zur Darstellung des Phymatorhusins aus denselben: Ich versetzte nämlich die Lösung mit dem 20fachen Volumen 10%iger Salzsäure und kochte dieselbe damit durch 8 Stunden. Der gebildete schwarze flockige Niederschlag wurde auf ein Filter gebracht, bis zur Entfernung der Salzsäure mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther und schließlich, und zwar



zur Entfernung des freien Schwefels, welcher als Produkt dieser Hydrolyse regelmäßig den schwarzen Niederschlag begleitete, mit Schwefelkohlenstoff ausgewaschen. Ein Teil von diesem Niederschlag wurde nach dem Verdunsten des Schwefelkohlenstoffs in einen Exsikkator gebracht (Präparat A): ein anderer wurde vorher durch Auflösen in Ammoniak und Fällen mit Salzsäure noch gereinigt (Präparat B). Zur Analyse wurden die Präparate bei 100° C. in vacuo über Schwefelsäure getrocknet.

Im trockenen Zustand stellte dieser Körper, welcher «Uromelanin» genannt werden mag, schwarze Brocken dar, welche sich zu einem schwarzen Pulver zerreiben ließen, welches dem Asphalt ähnlich war. Seine Löslichkeit in Ammoniak und in Alkalien und Unlöslichkeit in Alkohol erinnerte an die «Substance noire particulière» von Proust und das «Uromelanin» von Thudichum, gleichzeitig aber an die von Nencki und seinen Mitarbeitern aus dem melanotischen Sarkom der Haare und der Chorioidea erhaltenen Phymatorhusin und andere Melanine, mit denen es, wie aus dem Vergleich seiner Zusammensetzung mit der Zusammensetzung dieser Farbstoffe ersichtlich ist, auch wohl nahe verwandt ist.<sup>1)</sup>

Tabelle VII.

Analyse des aus dem Urochrom erhaltenen Melanins.

	Präparat A	Präparat B	Farbstoff der Menschenhaare (N. Sieber)	Farbstoff der Roßhaare (N. Sieber) <sup>2)</sup>	Hippomelaninsäure (Nencki und Sieber) <sup>3)</sup>
	‰	‰	‰	‰	‰
C.	59,16	—	56,14	57,6	59,93
H	4,91	—	7,57	4,2	3,86
N	9,69	—	8,5	11,6	10,41
S	3,55	3,81	4,10	2,1	2,6
O	22,69	—	—	24,5	—

<sup>1)</sup> Das Uromelanin ist vielleicht auch mit den schwarzen Körpern verwandt, welche bei der Hydrolyse von Eiweißstoffen mit Mineral-

<sup>2)</sup> M. Nencki, Opera Omnia. Bd. I, S. 821 u. 822.

<sup>3)</sup> M. Nencki, Opera Omnia. Bd. II, S. 31.



### C. Ursprung des gelben Harnfarbstoffes.<sup>1)</sup>

Die Autoren, welche den gelben Harnfarbstoff untersuchten, nahmen einen innigen Zusammenhang desselben mit dem Urobilin und daher auch eine nahe Verwandtschaft desselben mit dem Blutfarbstoff an. R. Maly betrachtete Thudichums Urochrom als eine dem Hydrobilirubin sowie dem Bilirubin<sup>2)</sup> nahestehende Verbindung. In seinen Untersuchungen über das Bilirubin und dessen Derivate bekämpfte Thudichum diese Behauptung. Sowohl in bezug auf die optischen Eigenschaften als auch besonders auf die Spaltungsprodukte bestehen nach Thudichum zwischen dem Urochrom und dem Hydrobilirubin unvereinbare Gegensätze (*inconciliable differences*).<sup>3)</sup> Noch in seiner ersten Arbeit sprach Thudichum die übrigens theoretische Ansicht aus, daß das Urochrom ein Derivat des Eiweißes und nicht des Blut- oder des Gallenfarbstoffs zu sein scheint.<sup>4)</sup> Trotzdem wurde die Ansicht von Maly nicht verlassen. Im Gegenteil kamen Riva, Chiodera und Garrod auf Grund von Versuchen zu der Anschauung, daß zwischen dem Blutfarbstoff und Urochrom ein inniger Zusammenhang besteht und zwar der Art, daß man von Urochrom zum Urobilin und umgekehrt

säuren entstehen und welche von Mörner den melanoiden Säuren von Schmiedeberg zugerechnet wurden (Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 600, und Bd. XXXIV, S. 205). Dieselben sollen nach Chittenden und Albro (Americ. Journ. of Physiol., Bd. II, S. 291), Rosenfeld (Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XLV, S. 51) und F. Samuely (Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. II, S. 369) zwar in verschiedener Menge, je nach der Natur des Ausgangsmaterials, jedoch konstant Schwefel enthalten.

<sup>1)</sup> In einer vor kurzem erschienenen Abhandlung (Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 141 und 145) hatte H. Liebermann Zweifel ausgesprochen, daß die von mir gemeinschaftlich mit Bondzyński und Panek in der bereits genannten vorläufigen Mitteilung unter dem Namen «Urochrom» beschriebene Verbindung wirklich Farbstoff wäre. Das nun Vorgetragene macht wohl überflüssig, diese rein spekulative Deduktion, der keine Beobachtung zugrunde liegt, zu bekämpfen.

<sup>2)</sup> R. Maly, l. c. S. 77.

<sup>3)</sup> Journ. of the Chem. Society, Bd. XIII (1875), S. 396, 398, 401 und 402.

<sup>4)</sup> The British medic. Journ., Bd. II (1868), S. 518, Results and theses.



gelangen könne, und diese Ansicht fand, wie es scheint, auch allgemeine Zustimmung.

Riva und Chiodera erhielten durch Oxydation von Urobilin mit Kaliumpermanganat einen Farbstoff, welcher die Eigenschaften des Urochroms besaß, woraus sie schlossen, daß das Urochrom, wiewohl es sich wesentlich vom Urobilin unterscheidet, doch auf dasselbe bezogen werden kann und gleichen Ursprungs ist.<sup>1)</sup>

A. Garrod gelangte von dem Urochrom zum Urobilin angeblich auf die Weise, daß er die aus dem Harn nach seiner Methode erhaltene reine alkoholische Urochromlösung mit Aldehyd versetzte, worauf namentlich nach dem Erwärmen die vorher im Spektroskop indifferente Urochromlösung einen deutlichen Absorptionsstreifen beobachten ließ, dessen Lage dem Urobilinband genau entsprach. Überdies gab eine solche Lösung mit ammoniakalischem Zinkchlorid eine prächtige grüne Fluoreszenz. Diese Tatsache in Verbindung mit den Untersuchungen der vorangeführten Autoren erlaubt es nach der Meinung Garrods mit größter Wahrscheinlichkeit zu behaupten, daß der gelbe Harnfarbstoff vom Blut- oder Gallenfarbstoff abstammt.<sup>2)</sup>

Ich habe die Untersuchungen Garrods mit einer alkoholischen Lösung eines reinen Urochroms, den ich aus einer größeren Menge Harn gewonnen hatte, wiederholt. Da nach der Ansicht dieses Autors nur der in der Wärme und im Licht abgestandene Aldehyd die Umwandlung des Urochroms in Urobilin verursacht, so war es angezeigt, zuerst aktiven Aldehyd vorzubereiten. Zu diesem Zwecke nahm ich gewöhnlichen Aldehyd, welcher durch einige Monate im Lichte gestanden hatte: daß derselbe im Sinne Garrods aktiv war, davon überzeugte ich mich an Urobilinlösungen.

Aus den Untersuchungen von Hopkins und Garrod<sup>3)</sup> ist bekannt, daß eine mit Wasser oder Äther versetzte Urobilinlösung nach dem Abdampfen auf dem Wasserbade ihre optischen Eigenschaften einbüßt, ähnlich wie das mit Kalium-

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> Journ. of Physiol., Bd. XXII, S. 462.



permanganat nach Riva und Chiodera oxydierte Urobilin. Unter dem Einflusse des «tätigen» Aldehyds kehrt das dem Urobilin eigentümliche Band im Spektrum zurück.

Durch den von mir bereiteten Aldehyd erhielten tatsächlich die auf die erwähnte Weise veränderten Urobilinpräparate ihre ursprünglichen optischen Eigenschaften zurück. Nach Hinzufügung eines solchen Aldehyds zu den veränderten Urobilinlösungen trat ein deutlicher Streifen an jener Stelle auf, an welcher er früher nicht vorhanden war. Eine alkoholische Urochromlösung wurde dagegen durch diesen Aldehyd hinsichtlich des Erscheinens eines Bandes in keiner Weise beeinflusst. Garrod hatte höchstwahrscheinlich in seinen Lösungen ein Gemenge von Urochrom und von einem anderen Farbstoff, vielleicht eben von dem soeben beschriebenen Chromogen, welches mit Aldehyd die charakteristische Reaktion gab. Angesichts dieser Resultate kann auch die von Garrod empfohlene Methode des qualitativen Nachweises von Urochrom in den Flüssigkeiten tierischen Ursprungs nicht mehr aufrecht erhalten werden. Das Verwandtschaftsband, welches das Urochrom mit dem Hämatin oder dem Urobilin verknüpfen sollte, besteht tatsächlich nicht. Die Gegenwart des Schwefels im Urochrommolekül beweist vor allem, daß das Urochrom nicht vom Hämatin abstammt. Durch seine elementare Zusammensetzung unterscheidet sich das Urochrom vom Urobilin wesentlich, mehr als durch den Mangel der charakteristischen Absorptionsstreifen im Spektrum, wie sich dies aus der nachstehenden Zusammenstellung ergibt:

Tabelle VIII.

	Urochrom %	Urobilin <sup>1)</sup> %
C	43,09	63,58
H	5,14	7,84
N	11,15	4,11
S	5,09	—
O	35,53	24,47

<sup>1)</sup> F. S. Hopkins und A. S. Garrod, l. c.



Die Tatsache, daß das Urochrom Schwefel enthält, beweist schon allein, daß dasselbe aus eiweißartigem Material sich bildet. Dafür spricht auch eine Reihe anderer Beobachtungen, welche in dem experimentellen Teile dieser Arbeit mitgeteilt wurden.

Urochrom enthält in seinem Molekül keinen Hämopyrrol-, sondern einen Pyrrolring, dessen Vorhandensein im Eiweißmolekül Schutzenberger als erster durch Spaltung des Eiweißes mit Barythydrat bei einer Temperatur von 150° konstatierte: <sup>1)</sup> später hatte Maly mittels einer ähnlichen Methode die Gegenwart eines Pyrrolrings in den Oxydationsprodukten des Eiweißes, namentlich in der Oxyprotosulfonsäure nachgewiesen. <sup>2)</sup> Durch Säuren wird das Urochrom in der Wärme zerlegt und liefert unter anderen Spaltungsprodukten einen schwarzen Farbstoff, welcher mit Rücksicht auf die Ähnlichkeit der Zusammensetzung und der Eigenschaften der Gruppe der echten Melanine zugerechnet werden muß.

Das Urochrom oder das aus demselben entstehende Uromelanin stellt für normale Verhältnisse das Korrelativ des pathologischen Phymatorhusins dar.

Bekanntlich hatte K. A. H. Mörner bald nach der Untersuchung von Nencki und Berdez <sup>3)</sup> über den Farbstoff der melanotischen Sarkome in Fällen von dieser Krankheit einen Farbstoff von der Zusammensetzung des Phymatorhusins auch im Harn gefunden. <sup>4)</sup>

An der Hand dieser Beobachtung wurde von Mörner die Frage erörtert, ob nicht etwa im normalen Harn ein dem Phymatorhusin entsprechender Farbstoff enthalten wäre. Zur Entscheidung dieser Frage fällte Mörner den Harn mit Baryumhydroxyd und hierauf das Filtrat mit basischem Bleiacetat. Den Baryumniederschlag zerlegte er mit Natriumcarbonat in

---

<sup>1)</sup> Schutzenberger et Bourgeois, Bull. Soc. Chim. (1876), S. 289, auch Dictionnaire de Chimie de Wurtz, 1<sup>er</sup> supplément; Matières albuminoïdes.

<sup>2)</sup> Monatsh. f. Chem., Bd. V, S. 137 (1885).

<sup>3)</sup> M. Nencki, Op. omnia, Bd. I, S. 806 (1885).

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 66 (1887).



der Wärme, erhielt aber keinen dem Phymatorhusin ähnlichen Farbstoff.<sup>1)</sup> Er fand zwar, daß der von ihm erhaltene Bleiniederschlag Schwefel enthielt, maß aber dieser Beobachtung offenbar keine Bedeutung bei und ließ auf diese Weise die Frage vollkommen offen: daß er jedoch sich klar war, daß von der Erforschung des Harnfarbstoffs Licht über die Entstehung der melanotischen Farbstoffe zu erwarten wäre, folgt aus dem Schluß seiner Arbeit, worin er die Notwendigkeit der Untersuchung des Harnfarbstoffs betont.

Von dem richtigen Wege zur Erforschung der in Rede stehenden Frage wurde Mörner offenbar abgeleitet durch die unrichtige Vorstellung, daß die Melanine Derivate des Blutfarbstoffs wären.

Es entspann sich darüber auch eine Polemik zwischen Mörner und Nencki, welche in der Differenz der Anschauungen über die Rolle des im Phymatorhusin gefundenen Eisens gipfelte, indem Mörner das Eisen für den wesentlichen Bestandteil des Phymatorhusins, Nencki dagegen für eine zufällige Beimengung hielt.

Diese Divergenz der Ansichten, welche die Frage unentschieden ließ, veranlaßte mich, das Urochrom auf Eisengehalt zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde ein rohes Präparat des Urochromkupfers in einem Kjeldahlschen Kölbchen mit konzentrierter Schwefelsäure in der Siedhitze unter Zusatz von Salpetersäure oxydiert, jedoch in der erhaltenen schwefelsauren Lösung nicht die geringste Spur von Eisen gefunden. Wenn aber das Eisen im Urochrom sich nicht vorfand, so konnte es ebenfalls im Uromelanin nicht enthalten sein.

Wenn dies aber der Fall ist, so ist in Anbetracht der großen Ähnlichkeit des Uromelanins mit den erwähnten melanotischen Farbstoffen die Annahme berechtigt, daß das in denselben gefundene Eisen an dem Bau dieser Farbstoffe sich nicht beteiligt.

Damit ist aber das einzige Moment hinfällig geworden, welches dafür zu sprechen schien, daß die Melanine aus der chromogenen Gruppe des Blutfarbstoffs entstehen können, und

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 139.



die Ansicht von Nencki, daß die Melanine von Eiweiß direkt sich ableiten,<sup>1)</sup> behält ihr Recht.

In der Verfolgung des Gedankens, daß im Eiweißmolekül die Muttergruppen sowohl des Hämatins wie auch von anderen tierischen Farbstoffen enthalten sind, hatte Nencki mit der Erforschung des Proteinochroms, welches früher von Stadelmann aus den Produkten der tryptischen Verdauung von Eiweißstoffen durch Fällung mit Brom erhalten worden war, sich befaßt.

Nencki<sup>2)</sup> erhielt aus dem sogenannten Proteinochrom zwei farbige Körper und zwar einen von violettroter Farbe, welcher eine größere Menge Brom, dagegen nur wenig Schwefel, und einen anderen Körper von mehr brauner Farbe, welcher im Gegenteil weniger Brom, dagegen mehr Schwefel enthielt. Die Vermutung Nenckis, daß die violettrote Verbindung die Muttersubstanz des Bilirubins und Hämatoporphyrins wäre, wurde allerdings nicht bestätigt. Durch Hopkins und Cole<sup>3)</sup> wurde erwiesen, daß Nencki die von ihm selbst früher auf Grund von theoretischen Erwägungen im Eiweißmolekül vermutete Skatolaminoessigsäure in seinen Händen hatte.

Durch die schöne Untersuchung von Hopkins und Cole ist jedoch das Interesse für die Skatolaminoessigsäure derart in den Vordergrund getreten, daß man die Beobachtung von Nencki, daß einer von den Bromkörpern eine nicht unbedeutende Menge Schwefel enthielt, außer acht ließ. Hopkins und Cole<sup>4)</sup> hatten zwar zuerkannt, daß die braunviolette Bromverbindung von Nencki, sowie der schwarze Körper von Kurajew<sup>5)</sup> von Skatolaminoessigsäure sich nicht ableiten, jedoch zugleich der Annahme von Kurajew, welcher auf eine angeblich ähnliche Ansicht von Nencki, daß der Schwefelgehalt auf eine Verunreinigung zurückzuführen wäre, obgleich entschieden

<sup>1)</sup> M. Nencki, Opera omnia, Bd. II, S. 39 und 87.

<sup>2)</sup> Opera omnia, Bd. II, S. 513 und 514.

<sup>3)</sup> Journ. of Physiol., Bd. XXVII, S. 418.

<sup>4)</sup> Journ. of Physiol., Bd. XXIX, S. 451.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 501.



mit Unrecht sich berief, beigestimmt. Von Nencki wurde eine solche Ansicht niemals ausgesprochen.

Im Lichte des Befundes, daß das Urochrom eine hoch molekulare, stickstoff- und schwefelhaltige Säure ist, welche in sehr naher Beziehung zu Eiweißstoffen steht und daß es ein echtes, schwefelhaltiges Melanin bei der Zersetzung liefert, gewinnt die Beobachtung, daß unter den Spaltungsprodukten der tryptischen Verdauung sich eines befindet, welches eine schwefelhaltige, chromogene Gruppe enthält, ein besonderes Interesse, welches zur Erforschung der Muttersubstanz des von Nencki beobachteten brom- und schwefelhaltigen, braunvioletten Farbstoffs auffordert.

Dieses Interesse wurde noch gesteigert, als ich die von Nencki für die Zusammensetzung dieses Bromkörpers erhaltenen Prozentzahlen auf eine bromfreie Verbindung umgerechnet hatte. Es ergab sich, wie aus der beigelegten Tabelle (IX) er-

Tabelle IX.

	Braunviolette Verbindung von Nencki (ohne Br)	Uromelanin
	%	%
C	59,8	59,16
H	4,5	4,91
N	10,0	9,69
S	2,8	3,55

sichtlich ist, eine sehr auffallende Übereinstimmung der Muttersubstanz dieser farbigen Verbindung mit den für das Uromelanin gefundenen Werten.

#### Analytische Belege.

Zur Bestimmung des Kohlenstoffs und des Wasserstoffs wurden die Urochromverbindungen in einer offenen, mit Kupferoxyd und einer 10—15 cm langen Schicht von Bleichromat beschickten Röhre unter Vorlegen einer Rolle aus Kupferdrahtnetz im Sauerstoffstrom verbrannt. In



den Kalksalzen wurde der Kohlenstoff und der Wasserstoff, jeder für sich allein, bestimmt: Zur Bestimmung des Kohlenstoffs mischte ich nämlich die Substanz mit chromsaurem Bleioxyd und Kaliumbichromat. Der Stickstoffgehalt wurde nach der Methode von Dumas in der Ausführung von Guillemand und Dombrowski<sup>1)</sup> ermittelt. Zur Bestimmung des Schwefels wurde die Substanz mit Kalihydrat und Salpeter in einer silbernen Schale über der Flamme einer Benzinlampe geschmolzen. Es versteht sich von selbst, daß die dazu benutzten Reagenzien vollkommen schwefelfrei waren; die Salzsäure wurde zu dem Zweck im Laboratorium erzeugt. Mit Rücksicht auf den hohen Schwefelgehalt des Urochroms wurden bei der Bestimmung des Silbers in seinen Silbersalzen die Kautelen beobachtet, deren H. Salkowski<sup>2)</sup> in einer ähnlichen Angelegenheit sich bedient hatte.

Zu Tabelle I.

	Bestimmung des Kupfers			Bestimmung des Schwefels		
	Substanz g	Cu <sub>2</sub> S g	Cu %	Substanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S %
Präp. 1	0,2236	0,0606	21,64	0,5684	0,0750	1,81

Bestimmung des Stickstoffs mit der gasometrischen Methode.

	Substanz g	N in ccm	Barometerstand in mm	Temperatur in C.	N %
Präparat 1	0,1099	8,7	727,6	14°	9,01

<sup>1)</sup> Bull. des sciences pharmacolog., Juillet 1902.

<sup>2)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVI, S. 2497 (1893).



## Zu Tabelle II.

	Bestimmung des Calciums			Bestimmung der Kohle und des Wasserstoffes				
	Substanz g	CuSO <sub>4</sub> g	Cu %	Substanz g	CO <sub>2</sub> g	H <sub>2</sub> O g	C %	H %
Präp. A	0,2655	0,1261	13,99	0,1904	0,2520	—	36,09	4,41
				0,2560		0,10015	—	—
	Bestimmung des Silbers							
	Substanz g	Ag g	Ag %					
Präp. B	0,5868	0,3056	52,08					
Präp. C	0,3034	0,1519	50,06	0,2457	0,2032	0,0538	22,56	2,45
				0,2778	0,2308	0,0595	22,66	2,395

	Bestimmung des Stickstoffes mittelst der gasometrischen Methode					Bestimmung des Schwefels		
	Substanz g	N in ccm	Der reduzierte Barometerstand in mm	Temperatur in C.°	N %	Substanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S %
Präp. A	0,2310	13,95	727	16	6,82	0,3909	0,0640	2,249
Präp. B	0,1982	7,4	717	16	4,16	0,86096	0,07035	1,123
						0,2331	0,0193	1,13
Präp. C	0,1977	7,1	718	14	4,035	0,4198	0,0462	1,347

## Zu Tabelle III.

	Bestimmung des Stickstoffes mittelst der gasometrischen Methode					Bestimmung des Schwefels		
	Substanz g	N in ccm	Reduzierter Barometerstand in mm	Temperatur in C.°	N %	Substanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S %
Präp. A	0,0772	6,6	709,6	14	9,49	0,2240	0,0928	5,59
Präp. B	0,0839	8,0	719,8	13	10,78	0,2178	0,0932	5,89



Die Bestimmung der Kohle und des Wasserstoffes.

	Substanz g	CO <sub>2</sub> g	H <sub>2</sub> O g	C %	H %
Präparat A	0,1476	0,2453	0,070	45,32	5,26
Präparat B	0,1218	0,1939	0,05806	43,42	5,33

Zu Tabelle IV.

0,28956 g Substanz gaben	0,1241 g Ag	= 42,86% Ag
0,3176 „ „ „	( 0,2865 „ CO <sub>2</sub>	= 24,60% C
	( 0,8010 „ H <sub>2</sub> O	= 2,85% H
0,2319 „ „ „	14 ccm N bei 717 mm, 20° C.	= 6,63% N
0,44598 „ „ „	0,0801 g BaSO <sub>4</sub>	= 2,466% S

Zu Seite 223 u. 224.

Bestimmung des Stickstoffes nach Kjeldahl.					Bestimmung des Schwefels			
	Sub- stanz g	<sup>1</sup> / <sub>10</sub> -n- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ccm	<sup>1</sup> / <sub>10</sub> - Ba(OH) ccm	N %	Sub- stanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S %	Schwefel
Nieder- schlag A	0,9548 0,8997	104,5 99,6	0,7 2,6	15,264 15,131	0,8866 1,278 1,6265	0,2308 0,20199 0,04272	3,575 2,17 0,361	Der gesamte; Locker gebundene; Esterschwefel. (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Nieder- schlag B	— —	— —	— —	— —	0,36899 0,7534	0,0656 0,7035	2,44 0,638	Der gesamte; Locker gebundener.

Zu Tabelle VI.

Menge der Urochromlösung = 470 ccm.

Der Gesamtschwefel: in 5 ccm Flüssigkeit 0,0363 g BaSO<sub>4</sub>; 0,4687 g in der ganzen Flüssigkeitsmenge.

Abspaltbarer Schwefel (bestimmt nach Mörners Methode): in 15 ccm Flüssigkeit 0,0497 BaSO<sub>4</sub>; 45,6% des Gesamtschwefels.



238 St. Dombrowski, Über den spezifischen Farbstoff des Harns.

Schwefel in esterartiger Bindung, als  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (aus der ganzen Menge (470 ccm) der mit Salzsäure erwärmten Flüssigkeit): 0,5073 g  $\text{BaSO}_4$ ; 14,57% des Gesamtschwefels.

Flüchtiger Schwefel in Gestalt von  $\text{H}_2\text{S}$  (aus der ganzen Flüssigkeitsmenge): 0,0609 g  $\text{BaSO}_4$ ; 1,75% des Gesamtschwefels.

Der im Melaninniederschlage enthaltene Schwefel: 0,4129 g  $\text{BaSO}_4$ ; 11,85% des Gesamtschwefels.

Zu Tabelle VII.

Präparat A:

0,1815 g Substanz gaben	{ 0,3937 g $\text{CO}_2$	= 59,16% C
	{ 0,0796 g $\text{H}_2\text{O}$	= 4,906% H
0,12455 „ „ „	11 ccm N, 716 mm, 20,2° C.	= 9,6935% N
0,1994 „ „ „	0,05152 g $\text{BaSO}_4$	= 3,548% S

Präparat B:

0,2913 g Substanz gaben	0,0809 g $\text{BaSO}_4$	= 3,814% S
-------------------------	--------------------------	------------

---