

Indigobildende Substanzen im Harn («Harnindikan»).

I. Mitteilung.

Von

Dr. R. V. Stanford.

(Research Chemist, Cardiff City Mental Hospital, England.)

Mit einer Abbildung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juli 1913.)

Daß der Harn nach passender Behandlung Indigo liefern kann, ist schon längst bekannt und die indigoliefernde Substanz, das sogenannte Harnindikan, ist wiederholt Gegenstand chemischer und physiologischer Untersuchung gewesen. Nach Maillard¹⁾ erreichen die diesbezüglichen Veröffentlichungen die ungeheure Zahl von mehreren Tausenden. Da das Wichtigste aus dieser umfangreichen Literatur schon verschiedentlich zusammengefaßt worden ist,²⁾ so scheint es mir nicht nötig, in die Geschichte der Indikanfrage näher einzugehen. Es darf nur daran erinnert werden, daß einige Harne, wenn sie mit einer Säure und mit einem Oxydationsmittel versetzt werden, Indigo liefern. Als Oxydationsmittel sind alle möglichen sauerstoffreichen Verbindungen vorgeschlagen worden. Als Säure kommt konzentrierte Chlorwasserstoffsäure meistens zur Verwendung. Der gebildete Farbstoff wird gewöhnlich mit einem passenden Lösungsmittel (Chloroform) ausgezogen.

Die indigobildenden Substanzen des Harns kann man auch dadurch fassen, daß man sie durch Behandlung mit einer Säure

¹⁾ L. C. Maillard, *L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent*, Paris, Schleicher, 1903, S. XI und 114.

²⁾ Vgl. Maillard, *loc. cit.*; Wang, *Om Indikanuri*, Christiania, Jacob Dywad, 1900, S. 156 und XVI, auch diese Zeitschrift, *passim*; Ellinger, *Diese Zeitschrift*, Bd. 38, S. 178 (1903).

(Chlorwasserstoffsäure) und mit einer wässerigen Lösung von Isatin in Indirubin überführt.¹⁾

Nachdem von Baumann und Brieger²⁾ und von Hoppe-Seyler³⁾ gezeigt wurde, daß Kaliumindoxylsulfat mit Chlorwasserstoff und Oxydationsmitteln Indigo liefert, und nachdem sie Kaliumindoxylsulfat aus dem Harn von mit Indol gefütterten Tieren dargestellt hatten, ist allgemein angenommen worden, daß die indigoliefernde Substanz des menschlichen Harns (das Harnindikan) mit Kaliumindoxylsulfat identisch war.

Viele Untersuchungen sind auch zu dem Zweck ausgeführt worden, die physiologische oder pathologische Bedeutung der indigobildenden Substanzen des Harns aufzuklären. Dabei ist ihre Entstehung auf eine ganze Reihe von verschiedenen Faktoren bezogen worden. Außer verschiedenen körperlichen und geistigen Krankheiten sollen die Fleischnahrung und insbesondere die übermäßige Darmfäulnis zuerst in Betracht kommen. Wenn man aber die mangelhaften analytischen Daten, worauf diese Behauptungen sich stützen, kritisch überlegt, so wird man zu dem Schluß kommen, daß sie bloß eine allgemeine Meinung darstellen, welcher jeder exakte Beweis fehlt.

Zu diesen physiologischen Zwecken sind zuerst nur qualitative Proben angewandt worden. Andere Autoren haben aber später versucht, durch quantitative Bestimmung des «Indikans» exaktere Resultate zu erhalten. Die bekanntesten quantitativen Methoden rühren von Obermayer,⁴⁾ Wang,⁵⁾ Bouma,⁶⁾ Ellinger,⁷⁾ Maillard⁸⁾ und Folin⁹⁾ her.

¹⁾ Bouma, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 82 (1901); Bd. 39, S. 356 (1903).

²⁾ Baumann und Brieger, Diese Zeitschrift, Bd. 3, S. 254 (1879).

³⁾ Hoppe-Seyler, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 423; Bd. 8, S. 79 (1883).

⁴⁾ Obermayer, Diese Zeitschrift, Bd. 26, S. 427 (1898).

⁵⁾ Wang, Diese Zeitschrift, Bd. 25, S. 406 (1898); Bd. 27, S. 135 (1899).

⁶⁾ Bouma, loc. cit., Vgl. auch diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 348; Bd. 28, S. 576 (1899); Bd. 30, S. 117 (1900).

⁷⁾ Ellinger, loc. cit.

⁸⁾ Maillard, loc. cit.

⁹⁾ Folin, Amer. Journ. Physiology, Bd. 13, S. 53 (1905).

Die Tatsache, daß fast jeder Autor die Methoden seiner Vorgänger unbefriedigend gefunden hat, zeigt, daß eine genaue Methode zur Bestimmung dieser Substanzen noch zu suchen ist, und ich halte es deswegen für nicht nötig, die undankbare Arbeit einer eingehenderen Kritik der bisher veröffentlichten Methoden zu unternehmen, um so mehr, als ich die Frage gelegentlich einer anderen Arbeit schon behandelt habe.¹⁾ Einige Überlegungen in bezug auf die quantitative Bestimmung des Harnindigos werden sich auch weiter unten finden, in Zusammenhang mit den Versuchen, worüber ich hier berichten will.

In dieser ersten Mitteilung handelt es sich um die Eigenschaften der indigobildenden Substanzen und deren Zusammensetzung. In späteren Arbeiten hoffe ich über neue qualitative und quantitative Methoden zur Erkennung derselben berichten zu können.

Unbeständigkeit der indigobildenden Substanzen.

Im Laufe von drei Jahren habe ich mehr als 2000 Harn auf Indigo untersucht. Dabei habe ich die folgende Beobachtung gemacht und hundertmal bestätigt: die Substanzen, die Indigo liefern, sind unbeständig, d. h. ein indigogebender Harn verliert sehr oft innerhalb ein paar Stunden die Fähigkeit, Indigo zu liefern. Die Erscheinung ist aber nicht konstant. In einigen Fällen verschwinden die indigobildenden Substanzen im Laufe von 1—3 Stunden ganz, in anderen Fällen aber liefert der Harn nach mehreren Stunden oder Tagen sogar ebensoviel Farbstoff wie am Anfang. Es kommen auch alle mögliche Zwischenstufen vor. Bald beginnt das Verschwinden der indigoliefernden Substanzen sofort, bald erst nach ein paar Stunden: einmal verschwindet alles, dann wieder nur ein Teil, wonach der Rest längere Zeit unverändert bleiben kann.

Es kann erstaunen, daß in der umfangreichen Literatur dieses Gebiets diese auffallende Erscheinung bisher nicht erwähnt worden ist. Trotzdem ist sie von außerordentlicher Wichtigkeit. Was hilft die genaueste Bestimmungsmethode,

¹⁾ Journal of Mental Science Bd. 57, S. 291 (1911).

wenn die Substanz nicht mehr vollständig da ist? Da es oft geschieht, daß eine merkliche Verminderung des Indigogehalts eines Harns schon eine Stunde nach der Entleerung desselben zu beobachten ist, so läßt sich fragen, ob nicht dieser Prozeß noch in der Blase selbst vor sich geht. Es scheint mir jedenfalls außer Zweifel, daß die häufig sich widersprechenden Angaben über Harnindikan, sowie die Befunde über vermutliche Beziehungen zwischen Harnindikan und pathologischen Zuständen größtenteils in dieser Weise zu erklären sind. Dies ist um so mehr wahrscheinlich, als in vielen Fällen die üblichen «24stündigen» Portionen zur Analyse gekommen sind.

Die einzigen Versuche, bei denen dieser Tatsache Rechnung getragen wird, sind meines Wissens die, die ich selbst früher veröffentlicht habe.¹⁾ Es handelte sich darum, die Literaturangaben über Zusammenhang zwischen Harnindikan und Geisteskrankheiten nachzuprüfen, und die obenerwähnte Schwierigkeit wurde in der Weise umgangen, daß während des Tages und der Nacht mehrere Tage hindurch jede einzelne Portion des Harns der betreffenden Patienten sofort nach der Entleerung im Laboratorium untersucht wurde. Die Bestimmungsmethode war keineswegs genau, genügte aber für den damaligen Zweck, weil nur aus sehr großen Unterschieden Schlüsse gezogen wurden. Da die genannte Abhandlung wohl nicht allgemein zugänglich ist, so sei es gestattet, einige von den Resultaten hier kurz zu erwähnen, die in bezug auf die in dieser Arbeit behandelten Fragen von Interesse sind.

Es wurde gefunden, daß die Indigoausscheidung bei demselben Individuum sehr große Schwankungen zeigt. Die Menge entstandenen Indigos ändert sich nicht nur von einem Tag bis zum andern, sondern auch sogar von einer Harnportion bis zur nächsten. Dies ist aus den nebenstehenden Kurven I und II ersichtlich. In der Kurve I sind auf der Ordinatenaxe die Tagesmengen Indigo und auf der Abszissenaxe die Tage aufgetragen. Die Kurve II²⁾ ist aus denselben Versuchsergebnissen konstruiert, nur ist die in jeder Harnportion gefundene Menge Indigo auf

¹⁾ Journal of Mental Science, Bd. 57, S. 291 (1911).

²⁾ Die Vertikalskala ist zehnmal so groß als bei Kurve I.

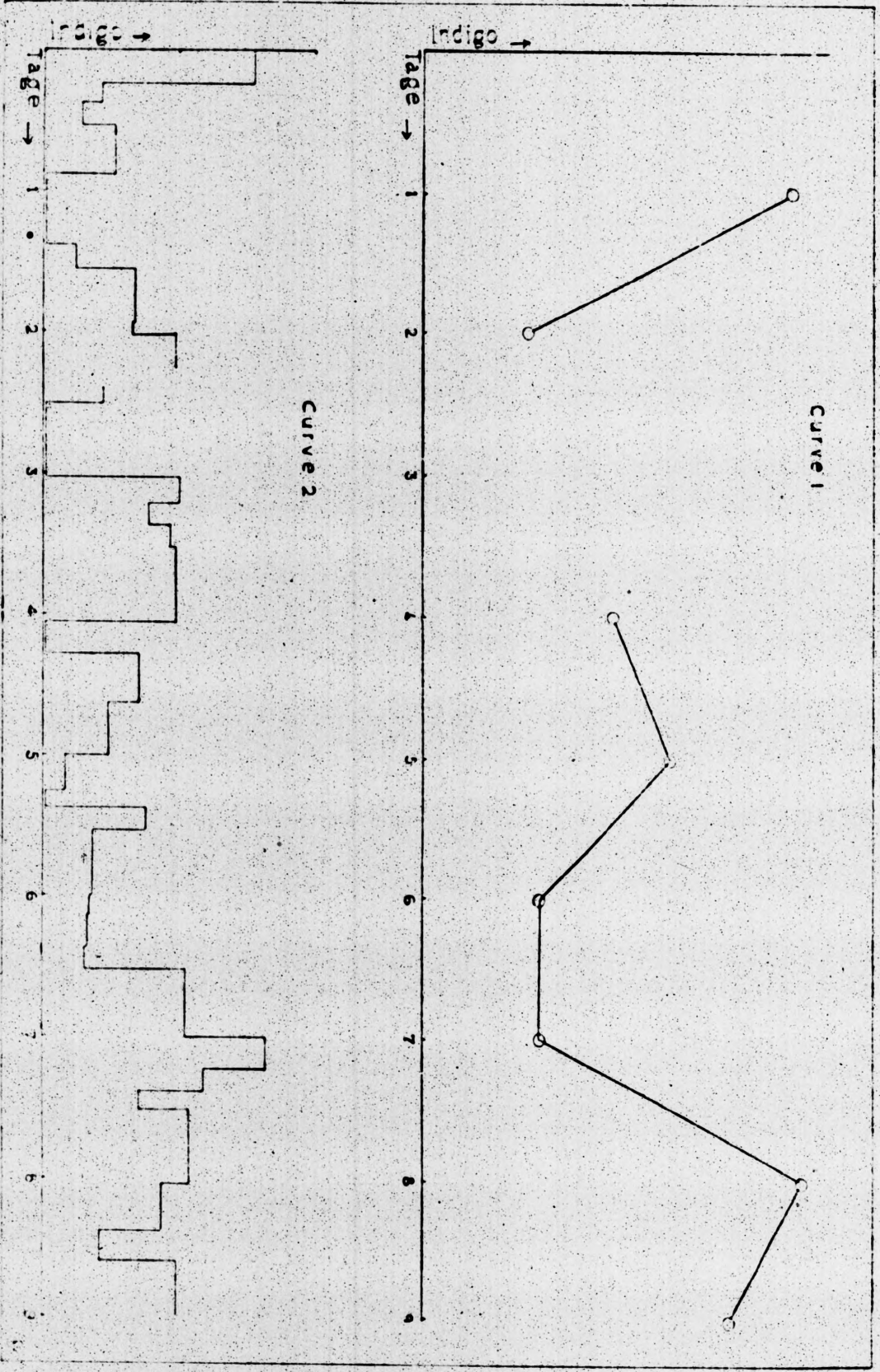


Fig. 1.

die Kurve getragen und mit der Ordinate der vorigen Portion durch eine horizontale Linie verbunden: infolgedessen sind die Höhen der horizontalen Linien der Indigomenge proportional, die in dem Zeitintervall zwischen den beiden Harnportionen entstanden ist. Es zeigt also diese Kurve annähernd die stündliche Änderung der Indigoausscheidung.¹⁾

Aus den in Kurve II enthaltenen Resultaten läßt sich auch ein Schluß ziehen, der mit Rücksicht auf die Frage der möglichen Zersetzung der indigobildenden Substanzen in der Blase von Interesse ist. Wenn nämlich diese Zersetzung auch in der Blase geschieht, so würde man erwarten, daß die nach langen Zeitperioden entleerten Harnportionen im allgemeinen weniger Indigo liefern als die, die in der Blase nur kurze Zeit geblieben waren. Man sollte also im Harn, welcher morgens früh entleert wird, weniger Indigo finden, als in den Tagesportionen, die oft nur eine oder zwei Stunden in der Blase gewesen sein können. Nach Kurve II ist dies aber nicht der Fall. Im Gegenteil findet man gewöhnlich die größten Indigomengen im Morgenharn. Dies stimmt auch mit meinen sonstigen Erfahrungen überein, wenn man in Betracht zieht, daß man nie im voraus sagen kann, ob ein bestimmter Harn Indigo liefern kann oder nicht.

Man muß also vorläufig annehmen, daß die indigobildenden Substanzen des Harns bis zum Entleeren desselben unvermindert bleiben. Dann lassen sich aber die Fragen stellen: Weshalb verschwinden diese Substanzen nachher und wie kann man dies verhindern?

Ich habe viele Versuche angestellt, um den Grund der Zersetzung zu finden und womöglich Mittel zu schaffen, wodurch sie vermieden werden konnten. Zu diesem Zweck wurde der Indigogehalt des Harns nach verschiedener Behandlung verfolgt und mit dem gleichzeitigen Indigogehalt desselben Harns ohne Behandlung verglichen. Der Unsicherheit aller Indigoproben im Harn zufolge wurden Schlüsse nur dann ge-

¹⁾ Dies ist die einzige Mitteilung der früheren Publikation, welche an dieser Stelle wiederholt wird.

zogen, wenn Indigo am Anfang vorhanden war und später nicht mehr nachweisbar wurde.

Die Ausführung dieser Versuche ist ziemlich unbequem, wenn man die Möglichkeit von zufälligen Erscheinungen ausschließen will. Die Versuchsergebnisse sind unter sich vergleichbar, nur wenn sie zu derselben Zeit und aus derselben Harnportion erhalten sind. Es muß also gleichzeitig eine zweite Versuchsreihe ausgeführt werden und außerdem muß man auch gleich nach der Entleerung des Harns die sämtlichen Versuche anstellen. Am Anfang wird die Anwesenheit der indigobildenden Substanzen durch eine qualitative Probe bestätigt, und die Indigoprobe wird nach kurzen Zeitintervallen mit sämtlichen Portionen und Kontrollen wiederholt. Es ist schon oben erwähnt worden, daß in einigen Fällen (wenn auch nur selten) die indigobildenden Substanzen auch im Harn, welcher keinerlei Behandlung unterworfen wird, längere Zeit unverändert bleiben können: infolgedessen können bei irgendwelcher Behandlung des Harns einzelne günstige Resultate nichts beweisen. Aus meinen Versuchen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

Reaktion. — Die Reaktion des Harns scheint keinen Einfluß auf die Zersetzung der indigobildenden Substanzen zu haben, solange sie nur schwach alkalisch oder sauer ist. Die Zersetzung wird nicht verhindert, wenn der Harn mittels Ammoniak, Natriumcarbonat, Natriumhydroxyd, Baryumhydroxyd, Kalkwasser oder Natriumphosphat schwach alkalisch gemacht wird, und sie geht auch vor sich, wenn der Harn durch die obigen Alkalien gegen Lackmus neutral gemacht wird oder durch Zusatz von Calciumcarbonat oder Baryumcarbonat neutralisiert wird. Auch Zusatz von Säuren allein (Essigsäure) oder von Säuren und reduzierenden Mittel (Zink, Kaliummetabisulfit) hindert die Zersetzung nicht. Bei Zusatz von größeren Mengen Säure oder Alkali verschwindet die Indigo-reaktion sehr bald.

Licht. — Die indigobildenden Substanzen verschwinden auch im Dunkel.

Temperatur. — In der Eiskammer verschwindet die

Indigoreaktion auch, jedoch gewöhnlich nicht so schnell, wie in demselben Harn bei Zimmertemperatur. Trotzdem ist der Indigo nach ein paar Stunden bei 0° oft nicht mehr nachweisbar, sodaß der Harn nicht auf diese Weise aufbewahrt werden kann.

Mikroorganismen und atmosphärischer Sauerstoff. — Diese beiden Faktoren lassen sich kaum trennen, einmal weil die Watte, wodurch die Bakterien ferngehalten werden, auch die Berührung mit der Luft teilweise vermindert, und zweitens weil durch das Fernhalten der Luft die Tätigkeit der aeroben Bakterien ebenfalls aufgehoben wird. Die Versuche, die die Bedeutung dieser beiden Faktoren aufklären sollten, haben sehr widersprechende Resultate gegeben.

Zuerst wurde das Verhalten von sterilen Harnen untersucht.¹⁾ In jedem Falle wurde die Sterilität durch Auftragen von 5 ccm des Harns auf Bouillon und 48stündige Aufbewahrung bei 37° bewiesen. Als Beispiele der Resultate lasse ich einige Versuchsprotokolle folgen.

a) Harn «BSU/1/2». Erhalten 5¼ Uhr nachm., den 30. Oktober; steril; Indigoprobe +.

10 Uhr vorm., 31. Oktober, Indigoprobe noch unvermindert.

Die Watte wurde dann (10½ Uhr vorm.) herausgenommen.

12½ Uhr nachm., 31. Oktober, Indigo noch unvermindert.

5 Uhr nachm., 31. Oktober, Indigo fast verschwunden.

b) Harn «BSU/1/1». Erhalten 4½ Uhr nachm., 6. November; steril; Indigoreaktion +.

12¼ Uhr nachm., 7. November, Indigo noch +.

3½ Uhr nachm., 8. November, Indigo noch +.

Der Harn wurde in 2 Gefäßen mit Watteverschluß aufbewahrt.

Um 3½ Uhr nachm., 8. November, wurde die Watte aus dem einen Gefäß herausgenommen; um

5½ Uhr nachm. konnte man in dieser Portion kein Indigo nachweisen.

Der andere (noch verschlossene) Teil gab dagegen ebensoviel Indigo, wie am Anfang, und die Indigoreaktion war am übernächsten Morgen (10½ Uhr) noch unvermindert. Zu dieser Zeit wurde die Watte herausgenommen: nach 2 Stunden (12½ Uhr, den 10. November) war Indigo in der Flüssigkeit überhaupt nicht mehr zu finden.

¹⁾ Die Harnen wurden unter aseptischen Bedingungen von meinem Kollegen Dr. E. Barton White gesammelt, dem ich auch an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

In diesen beiden Fällen sind die indigobildenden Substanzen im sterilen Harn längere Zeit unverändert geblieben: dann wurden die Watteverschlüsse der Gefäße herausgenommen, wonach innerhalb 2 Stunden die Indigoproben negativ ausfielen.

Eine Erklärung für diese Erscheinung ist schwer zu geben. Die Unsicherheit der Indigoprobe kann nicht daran schuld sein, weil es sich nicht um eine Verminderung des Indigogehaltes handelt, sondern um das vollständige Verschwinden desselben. Das Herausnehmen der Watte gibt aber nur die Möglichkeit zum Eintritt von Bakterien, und wenn überhaupt dadurch Keime hineingelangen, so ist es unglaublich, daß sie sich innerhalb 2 Stunden genügend entwickeln konnten, um die Zersetzung zu bewirken.

Gegen die Möglichkeit einer bakteriellen Zersetzung der indigobildenden Substanzen sprechen auch andere Versuche (die ich hier nicht im Detail wiedergeben will), wobei die Indigoreaktion auch im sterilen Harn ebenso schnell verschwunden ist, wie im nicht sterilen Harn.

Die indigobildenden Substanzen können auch bei Gegenwart von einigen Bakterien längere Zeit unverändert bleiben, wie z. B. aus dem folgenden Versuch hervorgeht.

Der Harn «BSU/2» wurde um 7¹/₂ Uhr 1. Dezember unter aseptischen Bedingungen gesammelt und besaß zu dieser Zeit eine deutliche Indigoreaktion. Nach 6 Tagen war der Indigogehalt ebenso groß, wie am Anfang. Der Harn war aber nicht steril. Die bakteriologische Untersuchung zeigte die Anwesenheit von drei Bakterienarten: 1. ein großer Bacillus, Gram positiv, wahrscheinlich *B. subtilis*, 2. ein großer Coccus, Gram positiv, 3. ein Staphylococcus, auch Gram positiv.

Wenn man daher die bakterielle Zersetzung für unwahrscheinlich halten muß, so bleibt nur übrig, anzunehmen, daß die in den obigen Versuchen nach Entfernen des Verschlusses stattfindende Zersetzung eine Folge des Zutritts der Luft sei. Es spricht aber manches dagegen, und vor allem die Tatsache, daß die Gefäße schon Luft enthielten und beim Entnehmen der verschiedenen Proben mehrmals in Berührung mit der Außenluft gekommen waren.

Ich habe in weiteren Versuchen das Verhalten von indigoreichen Harnen gegen Bakterien und Luft unter anderen Umständen verglichen. Die Tätigkeit von Bakterien wurde durch Zusatz von Toluol gehemmt, und Sauerstoff wurde dadurch entfernt, daß man während einer halben Stunde durch den Harn Kohlendioxyd leitete und die Flüssigkeit nachher in einer Atmosphäre von Kohlendioxyd aufbewahrte. Es wurden also verglichen:

1. Harn ohne Behandlung, an der Luft aufbewahrt;
2. Harn + Toluol, an der Luft aufbewahrt;
3. Harn mit CO_2 behandelt und in einer CO_2 -Atmosphäre aufbewahrt;
4. Harn + Toluol + Behandlung mit CO_2 wie bei 3.

Die Resultate der verschiedenen Versuchsreihen waren sehr verschieden. Bei jeder von den vier Behandlungen sind die indigobildenden Substanzen in einigen Fällen längere Zeit unzersetzt geblieben, in anderen Fällen aber sind sie rasch zersetzt worden.

Aus den oben erwähnten Versuchen geht hervor, daß man vorläufig nicht imstande ist, einen indigoliefernden Harn aufzubewahren und dabei die indigobildenden Substanzen mit Sicherheit unvermindert zu halten.

Es ist möglich, daß die Zersetzung ein Autoxydationsprozeß sei. Bei Pflanzen kommen Substanzen, die den Sauerstoff «aktivieren» bekanntlich häufig vor, und es ist möglich, daß tierische Produkte wie Harn solche Verbindungen auch enthalten können. Die Widersprüche, die ich bei der Untersuchung dieser Frage beständig getroffen habe, würden sich alle durch diese Hypothese erklären lassen, denn man kann sich wohl denken, daß die autoxydablen Substanzen sich nicht immer im Harn befinden. Bei deren Anwesenheit würden die indigobildenden Substanzen zersetzt (insbesondere bei Gegenwart der Luft). Dies würde den Befund erklären, daß die Luft in einigen Fällen die Zersetzung begünstigt und in anderen dagegen nicht. Die Untersuchung der Frage wird in dieser Richtung fortgesetzt.

Isolierung der indigobildenden Substanzen.

Die indigoliefernde Substanz des menschlichen Harns ist noch nicht isoliert worden.

Die Angaben in den Lehrbüchern und in der Literatur der Frage, wonach sie mit Kaliumindoxylsulfat identisch sei, beruhen nur auf den folgenden Tatsachen:

Die Meinung von Schunck (1854), daß Pflanzenindikan und Harnindikan identisch waren, wurde von Hoppe-Seyler (1875) bezweifelt.¹⁾ Baumann und Brieger²⁾ isolierten dann (1879) aus dem Harn eines mit Indol gefütterten Hundes eine Substanz, die mit Säuren und Oxydationsmitteln Indigo lieferte. Diese Substanz hielten sie für das «Indikan» des gewöhnlichen Menschenharns, und sie bewiesen, daß die von ihnen erhaltene Verbindung als Kaliumindoxylsulfat aufzufassen war. Für diese Konstitution wurden einwandfreie Beweise (einschließlich gut stimmender Analysen) von Baumann und Brieger geliefert, und die Substanz wurde außerdem noch von Baeyer³⁾ untersucht, der zu demselben Schluß kam.

G. Hoppe-Seyler⁴⁾ erhielt später (1883) aus dem Harn von Kaninchen, die mit *o*-Nitrophenylpropionsäure gefüttert worden waren, eine Substanz, die er für identisch mit dem von Baumann und Brieger dargestellten Kaliumindoxylsulfat hielt, obgleich er keine Analysen ausführte.

Hoppe-Seyler⁵⁾ erhielt auch aus 25 l normalen Hundeharns «einige Grammen» von einem Produkt, welches er für Kaliumindoxylsulfat erklärte; eine Analyse wurde aber nicht angegeben.

Die Darstellung von Kaliumindoxylsulfat nach der Methode von Baumann und Brieger ist verschiedentlich wiederholt worden.⁶⁾

¹⁾ Wang, op. cit.

²⁾ Baumann und Brieger, Diese Zeitschrift, Bd. 3, S. 254 (1879); Baumann und Tiemann, Berichte, Bd. 12, S. 1101 (1879). Bd. 13, S. 413 (1880).

³⁾ Baeyer, Berichte, Bd. 14, S. 1741 (1881).

⁴⁾ Hoppe-Seyler, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 403 (1883).

⁵⁾ Hoppe-Seyler, Diese Zeitschrift, Bd. 8, S. 79 (1883).

⁶⁾ Hoppe-Seyler, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 403 (1883); Ellinger, Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 178 (1903).

Keine von den obenerwähnten Arbeiten bezieht sich auf Menschenharn. Meines Wissens ist die einzige Angabe über die Beschaffenheit des Harnindikans beim Menschen die, die in einer Abhandlung von J. G. Otto¹⁾ enthalten ist. Dieser Autor isolierte aus 10 l eines diabetischen Harns «kleine Mengen einer in Schuppen oder Blättchen krystallisierenden Substanz aus, die sich bei näherer Untersuchung als indoxylschwefelsaures Kali erwies.» Analysen wurden anscheinend nicht ausgeführt, und es fehlt auch jede Angabe über die Untersuchung, wonach die Substanz sich «als indoxylschwefelsaures Kali erwies». Es läßt sich höchstens vermuten, daß die Substanz qualitative Proben auf Kalium, Schwefelsäure und Indigo gegeben hat. Wenn man sich aber daran erinnert, daß bei der Behandlung des Harns nach der von Otto gebrauchten Methode kalium- und sulfatreiche Produkte leicht erhältlich sind, und daß eine sehr kleine Beimengung von den indigoliefernden Substanzen genügen würde, um eine ausgeprägte Indigoprobe zu geben, so wird man diesen einzelnen Versuch als endgültigen Beweis für die Identität des Menschenharnindikans mit Kaliumindoxylsulfat kaum ansehen.

Es ist also ganz sicher, daß man Kaliumindoxylsulfat im Tierharn durch Fütterung mit Indol usw. erhalten kann, und es ist möglich, daß dasselbe Salz im normalen Hundeharn vorkommt. Es ist aber nur eine Annahme, wofür gar kein Beweis jemals geliefert worden ist, daß das «Harnindikan» beim Menschen Kaliumindoxylsulfat ist.

Trotz alledem wird diese Behauptung als bewiesene Tatsache in allen Lehrbüchern der Physiologie und Pathologie angeführt.

Bei dieser Sachlage schien es von Wichtigkeit, zu versuchen, die indigobildenden Substanzen des Menschenharns zu isolieren.

Versuche zur Isolierung nach der Methode von Hoppe-Seyler. Baumann und Brieger²⁾ erhielten das Kaliumindoxylsulfat aus dem Harn ihrer Versuchstiere nach einer

¹⁾ Otto, Pflügers Archiv, Bd. 33, S. 607 (1884).

²⁾ Baumann und Brieger, loc. cit.

Methode, welche später von Hoppe-Seyler¹⁾ einigermaßen vereinfacht und verbessert wurde. Nach Hoppe-Seyler wird der Harn zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wird dann mit 96%igem Alkohol extrahiert, und die Lösung durch Zusatz von Äther teilweise gefällt. Die klare Flüssigkeit enthält dann noch viel Harnstoff, welcher durch Zusatz von kalter, alkoholischer Oxalsäurelösung als Oxalat entfernt wird. Nach dem Alkalisieren des Filtrats (mittels Kaliumcarbonats) wird dieses zum Sirup eingedampft und der Sirup in absolutem Alkohol aufgenommen. Aus dieser Lösung sollte man durch Behandlung mit Äther usw. Krystalle bekommen, die viel Kaliumindoxylsulfat enthalten und sich weiter durch Umkrystallisieren reinigen lassen.

Es wurde zuerst versucht, diese Methode beim Menschenharn zu verwenden. Dabei wurde der ganze Prozeß durch die Indigoprobe kontrolliert, indem jedes Filtrat, jeder Niederschlag, Rückstand nach Eindampfen usw. auf Indigo untersucht wurde. Dies hatte vor allem den Zweck, festzustellen, ob auf diese Weise eine Isolierung der einzelnen indigobildenden Substanzen möglich ist. Dies war jedoch nicht festzustellen. Es wurde aber vielmehr gefunden, daß die indigobildenden Substanzen während des Prozesses allmählich verschwanden. Drei Isolierungsversuche wurden unter genauer Verfolgung der Hoppe-Seylerschen Methode durchgeführt. In jedem Falle wurde zum Schluß eine alkoholische Lösung erhalten, die viel weniger Indigo lieferte, als der verwendete Harn. Beim Behandeln mit Äther, Stehen im Eisschrank usw. verschwand dann auch der Rest der indigobildenden Substanzen allmählich aus der Lösung. Während dieser Behandlung fielen allerdings winzige Mengen krystallinischer Produkte aus, die aber keinen Indigo lieferten.

Das Hoppe-Seylersche Verfahren wurde dann in sieben weiteren Versuchen verschiedentlich modifiziert, doch mit gleichem Resultat.

Die obenerwähnten 10 Versuche wurden teils in großem, teils in kleinerem Maßstabe ausgeführt. In einem Fall wurden

¹⁾ Hoppe-Seyler, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 423 (1883).

104 l indigoliefernder Menschenharn aus dieser Anstalt verarbeitet, doch war Indigo zum Schluß aus keiner Fraktion zu erhalten.

Da sie erfolglos blieben, so will ich auf die Einzelheiten dieser überaus zeitraubenden Operationen nicht eingehen. Ich darf aber erwähnen, daß es mit Rücksicht auf die Unbeständigkeit der indigobildenden Substanzen des Menschenharns nach dieser Erfahrung keineswegs aussichtsreich ist, die Isolierung dieser Verbindungen auf diese Weise zu versuchen. Beim Verarbeiten der obenerwähnten 104 l indigoliefernden Harns habe ich mit Dampfheizung und mit Hilfe von anderen Einrichtungen fast fabrikmäßig gearbeitet und den Harn mit einer Geschwindigkeit von mehreren Litern pro Stunde eingedampft, doch verschwindet selbst während dieses Eindampfens ein erheblicher Teil der indigogebenden Stoffe. Dann ist die weitere Behandlung des Sirups und insbesondere die Entfernung des Harnstoffs sehr umständlich, sodaß es unmöglich ist, durch rasches Arbeiten die Gelegenheit zur Zersetzung zu vermindern.

Versuche zur Isolierung durch Fällung. Nachdem die Versuche zur Isolierung der indigobildenden Substanzen des Menschenharns nach der Hoppe-Seylerschen Methode resp. nach Modifikationen derselben aufgegeben werden mußten, wurde es versucht, dieselbe durch Fällung zu bewirken. Wenn die indigoliefernden Substanzen salzartig seien, so sollte es möglich sein, durch Zusatz von anderen Salzen resp. Basen oder Säuren eine doppelte Umsetzung zustande zu bringen, wonach die gesuchten Verbindungen in unlöslicher Form niedergeschlagen werden konnten.

Diesen Überlegungen zufolge habe ich zahlreiche Versuche angestellt, wobei indigoliefernde Harne, resp. eingedampfte Harne oder deren Lösungen in Alkohol, Amylalkohol, Äther-Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln mit Lösungen von Salzen, Basen und organischen Säuren versetzt wurden. Obgleich ich in dieser Weise unter den verschiedensten Bedingungen gearbeitet habe, habe ich doch nie einen indigoliefernden Niederschlag erhalten. Versuche, die indigogebenden

Substanzen durch Erzeugung von anderen Niederschlägen mit herunterzureißen, schlugen auch fehl.

Extrahieren der indigoliefernden Substanzen durch Lösungsmittel. Im Laufe der oben beschriebenen Versuche wurden Harne, eingedampfte Sirupe, Niederschläge usw. oft mit den üblichen organischen Lösungsmitteln behandelt, aber in keinem Falle wurde eine Trennung der indigobildenden Substanzen von den anderen vorhandenen Stoffen beobachtet.

Es gelang aber nach vielen Vorversuchen die richtigen Bedingungen zu treffen, unter denen durch Aussalzen und gleichzeitiges Extrahieren mit einer Alkohol-Äther-Mischung sämtliche indigobildenden Substanzen innerhalb weniger Minuten in verhältnismäßig reinem Zustande erhalten werden können. Bei zahlreichen Wiederholungen dieses Prozesses habe ich meistens gute Resultate erhalten, wenn die folgende Vorschrift genau verfolgt wird: selbst die kleinste Abänderung der Bedingungen führt aber zu schlechten Ausbeuten oder vielmehr zum Verschwinden der indigogebenden Stoffe während der Extraktion.

Dem indigoliefernden Harne¹⁾ (1 l) wird 700 g reines²⁾ festes Ammonsulfat, 400 ccm reiner³⁾ Äther und 100 ccm absoluter Alkohol hinzugesetzt. Darauf schüttelt man eine halbe Stunde lang auf der Maschine. Nach kurzem Stehen (nicht mehr als 10 Minuten) werden die beiden Schichten getrennt⁴⁾. Die ätherische Lösung enthält dann die indigobildenden Substanzen neben sehr kleinen Mengen anderer Stoffe, während

¹⁾ Eine bestimmte Menge (5 ccm) des Harns wird am Anfang auf Indigo nach der neuen Methode probiert, die ich demnächst veröffentlichen werde.

²⁾ Das Ammonsulfat darf nicht sauer reagieren.

³⁾ Der Äther darf Wasserstoffsperoxyd, Ozon oder Aldehyd nicht enthalten. Vgl. Krauch, Prüfung d. chem. Reagenzien.

⁴⁾ Eine scharfe Trennung wird oft durch die Bildung einer Emulsion erschwert. Zuzufolge der großen Unbeständigkeit der indigoliefernden Substanzen darf man dann nicht abwarten, sondern die Abtrennung nach einigen Minuten so gut wie möglich machen.

in der wässerigen Flüssigkeit (dem Harn) kein Indigo mehr zu finden ist.¹⁾

Durch dieses einfache Verfahren bewirkt man also in einer halben Stunde eine bessere Trennung der indigoliefernden Substanzen, als mittels der Methoden von Hoppe-Seyler und Baumann nach wochenlangem Arbeiten zu erzielen ist.

Wegen der außerordentlichen Unbeständigkeit der indigobildenden Substanzen ist es mir aber doch noch nicht gelungen, dieselben in festem Zustande zu erhalten.

Ätherische Lösung der indigobildenden Substanzen. Wenn ein kleines Volumen der ätherischen Lösung (z. B. 5 ccm) sofort nach der Gewinnung derselben auf dem Dampfbade rasch abgedampft wird, so hinterläßt es eine sehr kleine Menge eines farblosen (oder schwach rötlichen), öligen Rückstandes, welcher sich in Wasser leicht löst und bei der Indigoprobe ebensoviel Indigo liefert, als die entsprechende Menge des ursprünglichen Harns.

Beim Eindampfen größerer Mengen aber bekommt man einen rötlich-braungefärbten Rückstand, der einen eigenartigen, üblen Geruch besitzt und wenig oder kein Indigo liefert.

Wenn man die ätherische Lösung bei Zimmertemperatur eindunstet oder sie in den Vakuumexsikkator bringt, so ist im Rückstand kein Indigo mehr zu finden, wenn das Eindunsten mehr als einige Stunden gedauert hat.

Wenn durch rasches Eindampfen in kleinen Portionen Rückstände erhalten werden, die die indigoliefernden Stoffe noch enthalten, so verschwinden sie doch sehr bald. Das Aufbewahren im Eisschrank oder im Vakuumexsikkator hilft auch nicht, und es ist mir noch nicht gelungen, Rückstände so aufzubewahren, daß sie nach mehr als 20—30 Stunden noch Indigo liefern.

Die Rückstände sind natürlich allerlei Behandlungen mit Lösungsmitteln, Fällungsreagenzien usw. unterzogen worden zu dem Zweck, krystallinische Produkte zu isolieren, resp. etwaige

¹⁾ Die Proben werden nach der schon erwähnten Methode ausgeführt an Flüssigkeitsmengen, denen das anfänglich gewählte Quantum Harn (5 ccm) entspricht.

reaktionsfähige Verbindungen zu entfernen, die dieser Zersetzlichkeit zugrunde liegen könnten, doch bisher ohne Erfolg.

Der Extraktionsprozeß auch ist verschiedentlich modifiziert worden, doch sind die besten Resultate nach der obigen Vorschrift zu erhalten. Die lästige Emulsionsbildung wird verhindert, wenn dem Harn vorher ein Zehntel seines Volumens an Bleiessig zugesetzt wird. Das Abfiltrieren des Bleiniederschlages dauert aber beim Verarbeiten größerer Harnmengen so lange, daß viel indigobildende Substanz sich schon vor der Extraktion zersetzt hat. Außerdem scheinen die ätherischen Lösungen in diesem Falle noch zersetzlicher zu sein, wie sonst.

Wässerige Lösung der indigobildenden Substanzen. Die Extraktion der indigoliefernden Stoffe des Harns mittels der Alkohol-Äther-Mischung ist nur dann möglich, wenn gleichzeitig mit Ammonsulfat gesättigt wird. Dementsprechend gehen die Stoffe wieder in wässerige Lösung über, wenn der ätherische Auszug mit destilliertem Wasser geschüttelt wird. Leider ist die wässerige Lösung noch weniger haltbar, als die ätherische, und beim Einengen selbst im Vakuumexsikkator verschwinden die indigogebenden Substanzen sehr rasch. Versuche, die Zersetzung durch Neutralisieren, Alkalisieren usw. zu verhindern, schlugen auch fehl.

Beschaffenheit der indigobildenden Substanz.

1. Zusammenfassung. Die hier mitgeteilten Resultate, die in bezug auf die Frage der Natur der indigogebenden Stoffe des menschlichen Harns von Interesse sind, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Bei der Untersuchung von mehr als 2000 Harnen auf Indigo wurde gefunden, daß die indigobildenden Substanzen des menschlichen Harns außerordentlich unbeständig sind. In der Mehrzahl der Fälle ist die aus einem Harn erhaltene Indigomenge schon nach 1—3 Stunden erheblich vermindert; 3 bis 6 Stunden nach der Entleerung des Harns sind die indigobildenden Stoffe meistens ganz verschwunden. Es kommt aber auch vor, daß sie sich tagelang unvermindert halten. Die Zer-

setzung ließ sich auf den Einfluß von Reaktion, Licht, Temperatur, Bakterien oder atmosphärische Oxydation nicht zurückführen. Die Möglichkeit bleibt doch offen, daß sie vielleicht mit einem Autoxydationsprozeß verbunden sei.

Die Unbeständigkeit der indigoliefernden Stoffe ist natürlich bei der Untersuchung von Harn auf Indigo von großer Bedeutung. Da es bisher nicht gelungen ist, den Harn in irgend einer Weise so aufzubewahren, daß die Zersetzung mit Sicherheit ausgeschlossen wird, so kann man quantitative oder auch sogar qualitative Proben auf «Harnindikan» vorläufig nur ausführen, wenn man jede einzelne Portion sofort nach deren Entleerung untersucht.

Die indigobildende Substanz des Menschenharns ist noch nicht isoliert worden. Die Annahme, daß sie mit Kaliumindoxylsulfat identisch sei, beruht nur auf der Tatsache, daß man diese Verbindung aus dem Harn von mit Indol gefütterten Tieren darstellen kann.

Die hier mitgeteilten Versuche, die indigogebenden Stoffe mittels Eindampfens und nachheriger Behandlung gemäß der Methode von Hoppe-Seyler bei Tierharn zu isolieren, waren ohne Erfolg wegen der Zersetzung der Substanzen während des Prozesses (3 Versuche). Modifikationen dieses Prozesses, auch im großen (mit 104 l Harn) ausgeführt, waren auch ohne Resultate aus demselben Grund (7 Versuche). Versuche, die gesuchten Substanzen durch Fällungsmethoden zu erhalten, schlugen auch fehl.

Dagegen lassen sich die indigobildenden Substanzen durch Aussalzen und gleichzeitiges Extrahieren mit einer Alkohol-Äthermischung direkt aus dem Harn in kurzer Zeit gewinnen. Die ätherische oder auch die wässrige Lösung der Substanzen ist aber ebenso unbeständig, wie der ursprüngliche Harn, und infolgedessen ist deren Isolierung in festem Zustande noch nicht ausgeführt worden, obgleich die genannte Lösung äußerst wenig anderes Material enthält.

2. Natur der indigobildenden Substanzen. Die auffallende Unbeständigkeit der indigobildenden Substanzen, wie sie aus den hier mitgeteilten Versuchen hervorgeht, ist mit der

Annahme, daß sie aus Kaliumindoxylsulfat bestehen, kaum in Einklang zu bringen.

Kaliumindoxylsulfat ist damals von Baumann und Brieger¹⁾ und auch von Baeyer²⁾ eingehend untersucht worden, und in den zitierten Arbeiten sind ganz bestimmte Angaben über seine Beständigkeit unter verschiedenen Bedingungen vorhanden. Kaliumindoxylsulfat ist nämlich nur in saurer Lösung unbeständig; in neutraler Lösung tritt erst bei 120—130° vollständige Zersetzung ein, indes «mehrstündiges Erhitzen auf 160—170° bewirkte bei Gegenwart von Ätzkali keine Zersetzung».³⁾ Dagegen verschwinden die indigoliefernden Substanzen des menschlichen Harns bei Zimmertemperatur bei saurer, neutraler und auch alkalischer Reaktion.

Es ist immerhin möglich, daß die Zersetzung eine Folge der Anwesenheit von autoxydablen oder anderen reaktionsfähigen Stoffen sei, was die Unbeständigkeit von Kaliumindoxylsulfat in diesen Umständen erklären würde; doch muß betont werden, daß man keinen Beweis für die Anwesenheit solcher Substanzen besitzt.

Ogleich die Frage nach der Natur des Harnindikans sich vorläufig nicht entscheiden läßt, ist es doch unwahrscheinlich, daß das «Indikan» mit Kaliumindoxylsulfat identisch ist, und es ist eher anzunehmen, daß die indigoliefernden Substanzen des Menschenharns nicht immer dieselben sind, sondern ein Gemisch von nahe verwandten Verbindungen der Indigogruppe darstellen.⁴⁾ In dieser Weise läßt sich das abweichende Verhalten von verschiedenen indigoliefernden Harnen einfach erklären.

¹⁾ loc. cit.

²⁾ loc. cit.

³⁾ Baumann und Brieger, loc. cit.

⁴⁾ Nach Angaben, die in der Indikanliteratur zu finden sind, kommt es vor, daß indigoliefernde Harne schon an der Luft Indigo abscheiden, was auf die Anwesenheit von einer anderen indigoverwandten Substanz («Indoxylglykuronsäure») zurückgeführt worden ist. Beim Menschen dürfte diese Erscheinung sehr selten sein.