

# Indigobildende Substanzen im Harn («Harnindikan»).

## II. Mitteilung.

### Neue qualitative Proben.<sup>1)</sup>

Von

Dr. R. V. Stanford.

(Research Chemist, Cardiff City Mental Hospital, England.)  
(Der Redaktion zugegangen am 11. September 1913.)

Von den zahlreichen Proben auf «Indikan», die in den letzten fünfzig Jahren veröffentlicht worden sind, lassen sich prinzipiell zwei Gruppen unterscheiden. In den meisten Fällen werden die indigoliefernden Stoffe durch Behandlung mit einer Säure und einem Oxydationsmittel in Indigo übergeführt. Nach der anderen Methode werden sie durch Zusatz von Isatin und Säure in Indirubin übergeführt.

### Indigomethoden.

Bei den Methoden der ersten Gruppe sind sehr viele verschiedene Oxydationsmittel vorgeschlagen worden, u. a. die folgenden: Salpetersäure (Heller, 1845), Luft (Schunck, 1857, Maillard,<sup>2)</sup> 1903), Kaliumpermanganat (Hammarsten, 1870), Chlorkalk (Jaffe,<sup>3)</sup> 1870; Wolowski,<sup>4)</sup> 1901), Chlorwasser (Rosenstirn, 1872), Bromwasser (Michailow, 1887), Eisenchlorid (Obermayer,<sup>5)</sup> 1890), Wasserstoffsperoxyd (Loubiou,<sup>6)</sup> 1897), Carosche Säure (Amann,<sup>7)</sup> 1897), Kaliumperchlorat (Stryzowski,<sup>8)</sup> 1901), Persulfate (Rossi,<sup>9)</sup> 1907),

<sup>1)</sup> I. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 188 (1913).

<sup>2)</sup> Maillard, L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent, Paris, Schleicher, 1903, S. XI und 114.

<sup>3)</sup> Jaffe, Pflügers Arch., Bd. 3, S. 448 (1870).

<sup>4)</sup> Wolowski, D. med. Wochenschr., 1901, Nr. 2.

<sup>5)</sup> Obermayer, Wiener klin. Wochenschr., 1890, S. 176.  
Vgl. Baumann, Berichte, Bd. 12, S. 1098 (1879).

<sup>6)</sup> Loubiou, Chem. Zentralbl., 1897, Bd. 1, S. 620.

<sup>7)</sup> Amann, Chem. Zentralbl., 1898, Bd. 1, S. 152.

<sup>8)</sup> Stryzowski, Chem. Zentralbl., 1901, Bd. 2, S. 1181.

<sup>9)</sup> Rossi, Chem. Zentralbl., 1907, Bd. I, S. 1079.

Kupfersulfat (Salkowski,<sup>1)</sup> 1908; Imabuchi,<sup>2)</sup> 1909; Sammet,<sup>3)</sup> 1912.)

Als Säure wird meistens konzentrierte Chlorwasserstoffsäure verwendet. Unter diesen Bedingungen wird Indigo ausgeschieden, welcher dann durch Chloroform ausgezogen wird.

Es ist aber auch vorgeschlagen worden,<sup>4)</sup> durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure den Indigo in wasserlöslicher Form (Sulfindigotinsäure) zu erhalten. Lavallo<sup>5)</sup> versetzt den Harn mit Chlorwasserstoffsäure und Eisenchlorid, wonach durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure die Sulfindigotinsäure erzeugt wird.

Die obenerwähnten zahlreichen Modifikationen der Indigoprobe sind deswegen entstanden, weil die Probe die größte Unsicherheit zeigt. Es kommt sehr oft vor, daß man bei zwei Proben, mit demselben Harn ausgeführt, ganz verschiedene Resultate bekommt. Daher behaupten viele, die neue Oxydationsmittel vorgeschlagen haben, daß ihre «neue» Probe empfindlicher ist, als die vorher bekannten.

Hierbei kommt vor allem in Betracht, daß der gebildete Indigo besonders gegen Oxydationsmittel wenig beständig ist, sodaß bei der Ausführung der Probe leicht eine «Überoxydation» erfolgt. Diese «Überoxydation» ist schon von vielen Autoren, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, als Übelstand empfunden und die Anwendung aller möglichen Oxydationsmittel ist eine Folge des Bedürfnisses, Mittel und Wege zu finden, die indigobildenden Substanzen des Harns in Indigo überzuführen, ohne dabei den gebildeten Farbstoff weiter zu oxydieren.

Wie ich in der ersten Mitteilung erwähnt habe, habe ich mehr als zweitausend Indikanproben ausgeführt und dabei habe ich Gelegenheit gehabt, viele von den verschiedenen Oxydationsprozessen zu probieren.

Ich habe gefunden, daß die Gefahr der «Überoxydation»

<sup>1)</sup> Salkowski, Chem. Zentralbl., 1908, Bd. II, 1878.

<sup>2)</sup> Imabuchi, Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 502 (1909).

<sup>3)</sup> Sammet, Journ. Chem. Soc. Abstracts, 1912, Bd. 2, S. 703.

<sup>4)</sup> Cpaziani, Malys Jahresber., 1898, S. 276. Vgl. auch Rossi, loc. cit.

<sup>5)</sup> Lavallo, Chem. Zentralbl., 1907, Bd. 1, S. 194.

sehr schwer zu vermeiden ist, welche Oxydationsmittel man auch anwendet. Von allen vorgeschlagenen sauerstoffreichen Verbindungen ist das Wasserstoffsuperoxyd vorzuziehen, erstens weil es in verdünnter Lösung keine große Neigung zu dieser Überoxydation des gebildeten Indigos zeigt, und zweitens weil man beim Gebrauch dieser Substanz keine fremden Stoffe in das Reaktionsgemisch einführt, sodaß sekundäre Reaktionen unbekannter Art weniger zu befürchten sind.

Trotz aller Vorsicht konnte ich aber übereinstimmende Resultate mit Sicherheit bei Ausführung der Probe mit Wasserstoffsuperoxyd in der üblichen Weise nicht erhalten. Es wurden oft eine oder mehrere der folgenden Erscheinungen beobachtet;

1. Bei Ausführung der Probe nichts Auffallendes, jedoch stimmen die in zwei gleichzeitigen Proben erhaltenen Indigomengen nicht überein.

2. Beim Zusatz der Säure allein (ohne Oxydationsmittel) wird Indigo ausgeschieden, welcher aber beim Schütteln des Reagenzrohres wieder verschwindet.

3. Die Chloroformlösung des Indigos ist selten rein blau gefärbt; vielmehr ist sie gewöhnlich violett oder rötlich, und der Farbenton ist immer verschieden.

4. Die Chloroformlösung des Indigos entfärbt sich rasch.

Es ist mir schließlich gelungen, die Gründe dieser Erscheinungen aufzufinden und sie infolgedessen zu beseitigen.

**Entfärbung der Chloroformlösung.** Es handelt sich um ein rasches Entfärben, welches sich oft schon während der Ausführung der Probe vollzieht. Diese Zersetzung ist eine Folge der Anwesenheit von oxydierenden Verunreinigungen im Chloroform. Chloroform zersetzt sich langsam beim Aufbewahren, besonders im Licht, und man pflegt bekanntlich Spuren von Alkohol hinzuzusetzen, um diese Zersetzung zu verhindern. Die gebildeten Stoffe (Chlorverbindungen wie  $\text{COCl}_2$ ) verleihen dem Chloroform einen üblen Geruch nach Chlor, und das Lösungsmittel zeigt dann ausgeprägte Fähigkeit zum Oxydieren.

Die Entfärbung tritt also dann ein, wenn man mit altem, teilweise zersetztem Chloroform arbeitet, oder auch wenn

Chloroform angewendet wird, welches schon einmal zur Indigoprobe gebraucht worden ist. Das Chloroform wird nämlich durch Wasserstoffsperoxydlösung bei Gegenwart von Säure und von Harn sehr bald im obigen Sinne zersetzt, sodaß das schon einmal gebrauchte Lösungsmittel immer diese unerwünschte oxydierende Wirkung besitzt.

Der Übelstand läßt sich sicher und einfach auf folgende Weise vermeiden.

Man benutzt reines Chloroform und überzeugt sich, daß es die genannten Verunreinigungen nicht enthält. Hierzu bietet nach einiger Übung der Geruch eine empfindliche Probe. Die gebrauchten Indigolösungen sammelt man in einer Flasche, bis die Menge 1—2 l beträgt. Dann wird die Flüssigkeit sechsmal mit dem halben Volumen 1%iger Natriumhydroxydlösung ausgezogen, danach viermal mit Wasser. Es wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet, letzteres abfiltriert und die Flüssigkeit destilliert. Dem Destillat (welches keinen Geruch nach Chlor besitzen darf) setzt man 0,1% absoluten Alkohol hinzu. Das Chloroform wird in Flaschen von dunklem Glase und im Dunkeln aufbewahrt.

Wenn das Chloroform in obiger Weise gereinigt wird, so findet Entfärben bei der Indigoprobe nie statt, so lange man große Überschüsse an Wasserstoffsperoxyd vermeidet.

«Überoxydation». Die oben unter Nr. 2 angeführte Beobachtung, daß zuweilen schon ausgeschiedener Indigo beim Schütteln wieder verschwindet, führte mich zu dem Gedanken, ob nicht die Unregelmäßigkeiten eine Folge der Anwesenheit der Luft wären. Es ist dies in der Tat der Fall. Wenn man die Probe in geeigneter Weise mit Säure und Wasserstoffsperoxyd unter Ausschluß der Luft ausführt, so bekommt man bei Doppelproben übereinstimmende Resultate.

Inwieweit diese Verbesserung der Vermeidung einer «Überoxydation» des Indigos zuzuschreiben ist, ist fraglich. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, daß man durch Ausschließen der Luft sekundäre Reaktionen verhindert, die sonst die Oxydation der indigobildenden Substanzen zu Indigo teilweise stören. Diese Erklärung wird durch den auffallenden Befund gestützt, daß die

nach dieser neuen Methode erhaltenen Indigolösungen immer rein blau gefärbt sind.

Neue Indigoprobe («Kohlendioxydprozeß»). Nach verschiedenen Vorversuchen fand ich im Durchleiten von Kohlendioxyd ein einfaches und hinreichendes Mittel, die Luft fernzuhalten. Dementsprechend bezeichne ich die Methode als «Kohlendioxydprozeß», obgleich das Kohlendioxyd mit der eigentlichen Reaktion offenbar nichts zu tun hat.

Die Probe wird in der folgenden Weise ausgeführt:

Der Harn (5 ccm) wird in ein weites (ca. 2 cm) Reagenzrohr eingeführt und Kohlendioxyd wird 5 Minuten lang in ziemlich raschem Strom durchgeleitet. Das Einleitungsrohr zieht man bis zu einer 1 mm weiten Öffnung aus, welche in Berührung mit dem Boden des Reagenzrohres gestellt wird. Oben trägt das Reagenzrohr einen losen Watteverschluß. Nach 5 Minuten (ohne das Durchleiten des Gases zu unterbrechen) setzt man dem Harn 3 ccm reines Chloroform<sup>1)</sup> und 5 ccm konzentrierter, reiner<sup>2)</sup> Chlorwasserstoffsäure zu und beobachtet, ob das Chloroform im Laufe von 5 Minuten eine blaue Farbe annimmt. Nach 5 Minuten setzt man 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxydlösung<sup>3)</sup> (10 Vol.-Prozent) hinzu und nachher je 1 Tropfen in Zeitintervallen von 5 Minuten (nicht weniger; vgl. unten), bis die maximale Färbung der Chloroformlösung erreicht wird.

Das Durchleiten des Kohlendioxyds wird während der ganzen Zeit fortgesetzt und dient auch zu dem Zweck, das Chloroform in Berührung mit der wässrigen Flüssigkeit zu behalten, so daß der gebildete Indigo sofort ausgezogen wird, sobald er entstanden ist. Dies ist wichtig, weil der kolloidale Indigo von der wässrigen Flüssigkeit sehr rasch zersetzt wird, unter Bildung von amorphen, braunen Stoffen.

Zuweilen fängt die Chloroformlösung an, sich zu entfärben, während man den Zusatz des Wasserstoffsuperoxyds fortsetzt, sodaß ein Maximum zu beobachten ist. Aus diesem

<sup>1)</sup> Frei von den obenerwähnten oxydierenden Verunreinigungen.

<sup>2)</sup> Frei von Chlor und Chlorverbindungen.

<sup>3)</sup> Die Wasserstoffsuperoxydlösung soll ziemlich frisch bereitet sein (nicht länger als 2—3 Tage). Sie wird aus reinem Wasserstoffsuperoxyd («Perhydrol», Merck) hergestellt und ist vor Staub zu schützen.

Grund muß man erhebliche Zeitintervalle zwischen den successiven Zusätzen des Superoxyds lassen, um so mehr weil die Bildung des Indigos sehr langsam vor sich geht, viel langsamer als bei der gewöhnlichen Probe bei Anwesenheit der Luft. Es kann dies auf das Vorhandensein von Sauerstoffträgern in der Lösung hindeuten.<sup>1)</sup>

Wenn man zuverlässige Resultate haben will, so dauert eine Probe mindestens eine halbe Stunde. Gewöhnlich sind mehrere Tropfen Superoxydlösung dazu nötig, um die maximale Färbung hervorzurufen, doch sind die Harne in dieser Hinsicht sehr verschieden, selbst wenn die erreichte Farbtiefe ungefähr dieselbe ist.

Vereinzelte Harne geben nach etwa einer halben Stunde die maximale Färbung ohne Zusatz von Superoxyd. Es sind dies die Harne, bei denen die einmal gebildete Färbung eine Neigung zum Verschwinden zeigt. In solchen Fällen kann die Chloroformlösung oft durch Zusatz von Superoxyd oder Schütteln mit Luft entfärbt werden. Aus diesem Grund ist es ratsam, wenn in den ersten fünf Minuten vor dem Zusatz des Superoxyds eine Färbung entsteht, kein Superoxyd hinzuzusetzen, bis die Färbung nicht mehr zunimmt.

Annähernd quantitative Bestimmungen zu klinischen Zwecken. — Wie in der dritten Mitteilung über diese Frage gezeigt werden soll, ist die exakte quantitative Bestimmung der indigobildenden Substanzen mit allerlei Schwierigkeiten und Fehlerquellen verbunden. Die qualitative Probe auf Indigo im Reagenzrohr sollte aber die annähernde Schätzung der Indigomenge gestatten und viele der verschiedenen Formen der Indigoprobe, die schon empfohlen worden sind, sind bei klinischen Untersuchungen usw. zu diesem Zweck gebraucht worden. Vorausgesetzt, daß man über die Fehlerquellen und Genauigkeitsgrenzen solcher raschen Methoden einigermaßen unterrichtet ist, so ist gegen deren Gebrauch zu klinischen Zwecken prinzipiell nichts einzuwenden, denn man wird nie in Gefahr kommen, aus Unterschieden, die innerhalb der vermutlichen Fehlergrenzen liegen, Schlüsse zu ziehen. Bei dem Gebrauch der bisher üblichen

---

<sup>1)</sup> Vgl. I. Mitteilung.

«Indikan»-Proben im Harn aber ist dies nicht der Fall gewesen. Nicht nur bestimmt man dabei Substanzen unbekannter Natur nach Methoden, deren Genauigkeit sehr unwahrscheinlich ist, sondern man erhält auch bei demselben Harn nur selten übereinstimmende Resultate, zufolge der in dieser Mitteilung erörterten Unsicherheit der Probe. Es kommt noch dazu, daß die Chloroformlösungen des gebildeten Indigos fast nie rein blau gefärbt sind, sondern vielmehr alle Farbentöne von Blau über Violett bis Rot zeigen, wodurch auch selbst annähernd kolorimetrische Vergleiche unmöglich gemacht werden.

Die Ausführung der «Indikan»-Probe unter Ausschluß der Luft nach der oben beschriebenen Methode bringt hier jedenfalls eine Verbesserung. Es handelt sich freilich noch um eine Bestimmung unbekannter Verbindungen nach einer Methode, von deren Genauigkeit man keinen Beweis führen kann,<sup>1)</sup> doch gewinnt das Verfahren erheblich an Wahrscheinlichkeit, wenn man bei Doppelversuchen gleiche Resultate bekommt. Ferner sind die Chloroformlösungen bei dem neuen Prozeß immer rein blau, was einen kolorimetrischen Vergleich ermöglicht. Bei 632 «Indikan»-Proben, die ich nach der oben beschriebenen Methode ausgeführt habe, erhielt ich in keinem einzelnen Fall eine Indigolösung, welche violettstichig war. Außerdem repräsentieren die violetten oder rötlichen Extrakte bei den alten Proben sicher noch eine Fehlerquelle, indem in solchen Fällen offenbar ein Teil der indigobildenden Substanz nicht zu Indigo, sondern zu anderen Farbstoffen oxydiert worden ist.

Im Sinne der obigen Überlegungen kann also die folgende Methode zu raschen, annähernd quantitativen Bestimmungen dienen.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Diese Frage wird in der III. Mitteilung eingehend behandelt werden.

<sup>2)</sup> Es muß noch betont werden, daß für die Genauigkeit dieser (wie auch jeder anderen) Bestimmungsmethode keine Garantie gegeben werden kann, so lange die Isolierung der indigobildenden Substanzen des Menschenharns unerreicht ist. Doch kann man von dieser Methode sagen, daß sie Resultate liefert, die untereinander übereinstimmen, und infolgedessen (und auch aus anderen Gründen) ist den erhaltenen Werten der Gehalt an indigobildenden Substanzen aller Wahrscheinlichkeit nach annähernd proportional.

Die Überführung der indigobildenden Substanzen in Indigo wird mit einem passenden Volumen des Harns (50—100 ccm in den meisten Fällen) nach dem «Kohlendioxydverfahren» durchgeführt. Man muß genügend Chloroform hinzufügen, um sicher zu sein, daß der gebildete Indigo sofort ausgezogen wird. Die Menge des angewandten Harns ist so zu wählen, daß die Chloroformlösung nicht mehr als 50—100 ccm beträgt. Zum Schluß wird das Volumen der Indigolösung gemessen und ein aliquoter Teil davon mit Fehlingscher Lösung<sup>1)</sup> im Verdünnungskolorimeter<sup>2)</sup> verglichen.

#### Indirubinmethode.

Es ist schon in der Einleitung erwähnt worden, daß die indigobildenden Substanzen des Harns auch in der Weise gefaßt werden können, daß man sie durch Zusatz von Isatin und Chlorwasserstoffsäure in Indirubin überführt.

Die Kondensation von Indoxyl und Isatin zu Indirubin wurde von Baeyer entdeckt<sup>3)</sup> und die Reaktion wurde später von Beijerinck<sup>4)</sup> zur Bestimmung des Pflanzenindikans und nachher von Bouma<sup>5)</sup> zur Bestimmung des Harnindikans vorgeschlagen.

Auf diese Frage werde ich in einer demnächst in dieser Zeitschrift zu veröffentlichenden Arbeit über quantitative Bestimmung der indigobildenden Substanzen des Harns zurückkehren. Hier möchte ich nur erwähnen, daß die Isatinmethode in der von Bouma empfohlenen Form aus verschiedenen Gründen nicht viel zuverlässiger ist, als die bisher üblichen Indigotinmethoden.<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> Wie von Folin vorgeschlagen (Amer. Journ. Physiology, Bd. 13, S. 53 (1905).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 159 (1913).

<sup>3)</sup> Baeyer, Berichte, Bd. 14, S. 1745 (1881).

<sup>4)</sup> Beijerinck, Proc. K. Akad. Wentensch., 1899, S. 120; Vgl. Orchardson, Wood and Bloxam, Journ. Soc. Chem. Industry, Bd. 26, S. 4 (1907).

<sup>5)</sup> Bouma, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 84 (1901); Bd. 39, S. 356 (1903).

<sup>6)</sup> Ellinger, Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 178 (1903) ist auch zu diesem Schluß gekommen.

Man bekommt nicht reine Indirubinlösungen, sondern Gemische mit braunen und blauen Farbstoffen, die zu kolorimetrischen Zwecken unbrauchbar sind. Wie in der genannten Arbeit gezeigt werden soll, kann man aber das Isatinverfahren zu einer bequemen quantitativen Methode ausarbeiten, wenn die Reaktion unter Ausschluß der Luft ausgeführt wird. Die in dieser Weise modifizierte Isatinmethode kann man natürlich auch als qualitative Probe anwenden.

### Zusammenfassung.

Die meisten von den zahlreichen vorgeschlagenen Proben auf indigobildende Substanzen im Harn unterscheiden sich nur dadurch, daß verschiedene Oxydationsmittel zur Anwendung kommen.

Die erwähnten Methoden sind nicht befriedigend. Sie liefern bei Doppelversuchen keine übereinstimmenden Resultate; die Indigolösungen zeigen alle Farbentöne zwischen Blau und Rot; die Indigolösungen entfärben sich in vielen Fällen.

Das Entfärben der Lösungen ist in vielen Fällen eine Folge der Anwesenheit von oxydierenden Chlorverbindungen im Chloroform. Diese lassen sich in einfacher Weise entfernen.

Wenn die Probe unter bestimmten Bedingungen unter Ausschluß der Luft ausgeführt wird, so erhält man immer rein blau gefärbte Lösungen und übereinstimmende Resultate bei Doppelproben.

Die in dieser Abhandlung enthaltenen Angaben beziehen sich auf 632 Proben nach dem hier beschriebenen Kohlendioxydprozeß, deren Einzelheiten in der notwendigen Kürze nicht wiederzugeben sind.

Die Probe nach der Isatinmethode läßt sich in analoger Weise durch Entfernen der Luft verbessern und zu einer quantitativen Methode ausarbeiten, worüber in einer demnächst zu erscheinenden Abhandlung berichtet werden soll.

---