

## Zur Kenntnis der indigobildenden Substanzen im Urin.

### 1. Darstellung von indoxylschwefelsaurem Kalium aus menschlichem Urin.

Von

G. Hoppe-Seyler—Kiel.

(Der Redaktion zugegangen am 28. März 1916.)

Von den im Urin vorkommenden Substanzen, welche bei Behandlung mit starken Säuren und Oxydationsmitteln Indigo bilden, kommt hauptsächlich die von Baumann und Brieger<sup>1)</sup> zuerst dargestellte Indoxylschwefelsäure in Betracht. Diese erhielten sie aus Urin nach Eingabe von Indol gemäß der Beobachtung von Jaffé, daß Indolzufuhr Indikanausscheidung hervorruft. Aus Urin von Tieren, denen Orthonitrophenylpropiolsäure eingegeben war, habe ich dann auch indoxylschwefelsaures Kalium gewonnen,<sup>2)</sup> welches in allen seinen Eigenschaften und nach dem von mir bestimmten Schwefelsäuregehalt seiner Doppelverbindung mit Chinäthonsäure mit dem von Baumann und Brieger dargestellten Körper übereinstimmt. Ferner habe ich nach der in meiner Arbeit angegebenen Methode indoxylschwefelsaures Kalium aus normalem Hundeharn dargestellt.<sup>3)</sup> Otto<sup>4)</sup> hat auch aus einem reichlich Indigo bildende Substanz enthaltenden Urin eines Diabetikers nach meiner Methode geringe Mengen davon erhalten, ohne sie aber zu analysieren.

Außer der Schwefelsäureverbindung des Indoxyls ist auch die Indoxylglukuronsäure als indigobildende Substanz im Urin nachgewiesen worden. Schmiedeberg hatte ihr Vorkommen schon vermutet, und auch nach Orthonitrophenylpropiolsäure fand ich im Kaninchenurin stärkere Reduktion, Linksdrehung und Ausscheidung von Indigo bei kurzem Stehen an der Luft, was mir auf die Anwesenheit einer solchen leicht zersetzlichen

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 3, S. 254.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 7, S. 403, 1893.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 8, S. 79, 1884.

<sup>4)</sup> Pflügers Archiv, Bd. 33, S. 607, 1884.

Verbindung hinzuweisen schien.<sup>1)</sup> P. Mayer und C. Neuberg<sup>2)</sup> haben die Indoxylglukuronsäure auch im Bleiessig-Ammoniakniederschlag von normalem Urin nachgewiesen. C. Tollens<sup>3)</sup> hat durch Glukuronsäure und Ätherschwefelsäurebestimmungen nach Indoleingabe beim Menschen, Stern<sup>4)</sup> bei Tieren gefunden, daß dann neben Zunahme der Ätherschwefelsäure auch eine solche der Glukuronsäure auftritt, namentlich, wenn eine sehr reichliche Indolzufuhr erfolgt, da dann der Organismus zur Bindung des gebildeten Indoxyls besonders auf die Glukuronsäure angewiesen ist. Während Zufuhr von Phenol und Kresol namentlich stärkere Glukuronsäureausscheidung hervorrufen, führt Eingabe von Indol hauptsächlich zu Steigerung der Ätherschwefelsäure. Die Glukuronsäureverbindung des Indoxyls spielt also keine so große Rolle als indigobildende Substanz im Urin, wie die Indoxylschwefelsäure. Die Menge dieser Substanzen im Urin ist nun hauptsächlich abhängig von der Bildung und Resorption von Indol bei der Eiweißfäulnis im Darmkanal.

Ein Zweifel, daß das sogenannte Harnindikan wesentlich indoxylschwefelsaures Kalium sei, war nach den angeführten Untersuchungen gar nicht denkbar. Nun hat aber Stanford<sup>5)</sup> bestritten, daß die indigoliefernde Substanz im Harn indoxylschwefelsaures Kalium sei, weil er meint, daß sie sich zu leicht zersetze, was bei indoxylschwefelsaurem Kalium nicht der Fall sei. Dieser Schluß ist vollkommen falsch. Da er auch die Indoxylglukuronsäure nicht anerkennt, so nimmt er an, daß es sich bei dem sogenannten Harnindikan des Menschen um eine bisher noch nicht isolierte Substanz handle. Da die oben angeführten Untersuchungen aber so sicher gegen diese Annahme sprechen, und da indoxylschwefelsaures Kalium durchaus nicht so schwer zersetzlich ist, so war von vornherein seinen Ausführungen, die mit einer im Mißverhältnis zu der aufgewandten Arbeit und Gründlichkeit stehenden Lehrhaftigkeit und Überhebung

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 7, S. 425.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 29, S. 271, 1900.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 67, S. 138, 1910.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 68, S. 52, 1910.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 87, S. 188, 1913.

vorgetragen werden, kein Wert beizumessen. Wie ich noch in einer weiteren Arbeit zeigen werde, kommt es im Urin leicht zu Zersetzung der Indoxylschwefelsäure durch Bakterieneinwirkung, und auch die Isolierung des indoxylschwefelsauren Kaliums aus menschlichem Urin ist nach der von mir angegebenen Methode sehr gut möglich, wenn man dies berücksichtigt und sorgfältig arbeitet. Da indoxylschwefelsaures Kalium aus menschlichem Urin bisher nur in ganz geringen Mengen von Otto<sup>1)</sup> erhalten, aber nicht analysiert ist, so habe ich aus dem Urin eines an Darmtuberkulose leidenden Knaben, der reichlich Indigo bei der Jafféschen Probe lieferte, es isoliert.

Es wurde nur ganz klarer, unzersetzter Urin genommen. Dieser wurde möglichst rasch zum dünnen Sirup eingedampft, der Rückstand sofort mit reichlich Alkohol versetzt, in eine Flasche gespült. So wurden ca. 10 l verarbeitet.

Die abfiltrierte Lösung wurde mit der gleichen Menge Äther versetzt, 24 Stunden stehen gelassen, von dem zähen Bodensatz abgegossen, der Harnstoff mit konzentrierter alkoholischer Oxalsäurelösung in der Kälte gefällt, solange noch ein Niederschlag entstand, schnell filtriert und das Filtrat sofort mit konzentrierter Lösung von kohlenstoffsaurem Kalium bis zur alkalischen Reaktion geschüttelt. Dann wurde wieder filtriert, der Äther abdestilliert und der Rest zum dicken Sirup eingedampft, wobei durch tropfenweisen Zusatz von Kalilauge die Reaktion immer alkalisch erhalten wurde. Der Sirup wurde mit der ca. 20fachen Menge absoluten Alkohols versetzt und dann in einer Flasche 24 Stunden stehen gelassen. Der Niederschlag wurde dann abfiltriert. Er wurde noch mit 96%igem Alkohol ausgekocht, doch schied sich aus diesem Extrakt auch auf Zusatz von Äther kein indoxylschwefelsaures Kalium aus. Die mit absolutem Alkohol erhaltene Lösung wurde nun mit reichlich Äther versetzt, von den sich ausscheidenden Schmierer rasch abgegossen und dann in der Kälte stehen gelassen. Es schieden sich im Laufe der nächsten Tage Krystalle in Drusen an den Wänden aus. Diese wurden gesammelt und nochmals mit 96%igem Alkohol umkrystallisiert.

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

Die so erhaltenen weißen Krystalle gaben, im trockenen Reagenzglase erhitzt, purpurne Dämpfe, welche in den kälteren Teilen sich niederschlugen, lieferten Indigo, wenn ihre wässerige Lösung mit Salzsäure und Oxydationsmitteln versetzt wurden, und ergaben einen Niederschlag beim Erhitzen ihrer Lösung mit Salzsäure und Chlorbaryum. Die Hauptmenge des so erhaltenen indoxylschwefelsauren Kaliums befindet sich zuletzt in dem mit absolutem Alkohol erhaltenen Extrakt, während dem Rückstand, der bei dem nach Orthonitrophenylpropionsäure erhaltenem Urin auch reichlich davon enthielt, bei der Darstellung aus Menschenurin nur wenig davon beigemischt ist. Schon aus meiner ersten Arbeit geht hervor, daß man bei der Darstellung mit großen Verlusten arbeitet. In den sich ausscheidenden Schmierungen ist immer ein nicht unbeträchtlicher Teil der Indoxylschwefelsäure enthalten. Dann ist zu berücksichtigen, daß die Menge der im Urin ausgeschiedenen Indoxylschwefelsäure selbst bei starker Indigoreaktion nicht groß ist. Der Urin dieses Kranken, der sehr starke Indigoausscheidung gab, enthielt gewöhnlich 0,034 g  $\text{SO}_4$  als Ätherschwefelsäure in 100 ccm. Dies würde, wenn alle Ätherschwefelsäure aus Indoxylschwefelsäure bestände, 0,09 g indoxylschwefelsaurem Kalium entsprechen. In den 10 l Urin, die ich verarbeitete, konnten also höchstens 9 g davon enthalten sein. Da nun aber ein Teil der Ätherschwefelsäure mit Phenol und anderen aromatischen Produkten der Eiweißfäulnis in Verbindung steht, so ist die Menge bedeutend geringer. Daher war unter Mitwirkung der bei der Darstellung eintretenden Verluste die Ausbeute eine ziemlich geringe.

Um die erhaltene Substanz als indoxylschwefelsaures Kalium zu identifizieren, bestimmte ich nun noch die in ihr enthaltene Schwefelsäure.

Eine Menge von 0,203 g wurde in Wasser gelöst und auf dem Wasserbad mit konzentrierter Salzsäure und Chlorbaryum zersetzt. Es wurde nun nur 0,0502 g  $\text{SO}_4$  gefunden, die 0,131 g indoxylschwefelsaurem Kalium entsprechen. Die nach Abfiltrieren des schwefelsauren Baryums erhaltene Lösung gab mit Chlorcalcium im Überschuß versetzt und mit Ammoniak

stark alkalisch gemacht einen Niederschlag, der auf eine Beimengung von oxalsaurem Kalium infolge der Ausfällung des Harnstoffs mit überschüssiger Oxalsäure hinwies. Ich bestimmte nun die Oxalsäure nach dem von Schreiber, sowie Autenrieth und Barth<sup>1)</sup> angegebenen Verfahren. Die überstehende Flüssigkeit wurde auf einer Nutsche durch ein Doppelfilter gesaugt, zuletzt der Niederschlag darauf gebracht, mit wenig Wasser nachgespült, der Niederschlag in 15%iger Salzsäure gelöst, die Lösung 5 mal mit einem Gemisch von 150 ccm Äther und 5 ccm absolutem Alkohol ausgeschüttelt, das Extrakt mit 5 ccm Wasser versetzt, der Äther abdestilliert, der Rückstand auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Chlorcalcium und Ammoniak versetzt, dann mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert, 24 Stunden stehen gelassen und abfiltriert. Der Rückstand ergab im Tiegel geglüht 0,0275 CaO, entsprechend 0,079 oxalsaurem Kalium.

Da die Differenz zwischen der Menge der verwendeten Substanz und dem aus der Schwefelsäure berechneten indoxylschwefelsauren Kalium 0,072 g betrug, so bestanden also die dargestellten Krystalle zum Teil aus oxalsaurem Kalium, die Hauptmenge aus indoxylschwefelsaurem Kalium.

Es wurde nun ein Teil der gewonnenen Krystalle zur Beseitigung des oxalsauren Kaliums nach Ellinger<sup>2)</sup> in wenig Wasser gelöst, erhitzt mit einem Überschuß von Kalkwasser versetzt, um die Oxalsäure auszufällen, filtriert, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt, der gebildete kohlensaure Kalk abfiltriert, das Filtrat zur Trockene verdampft, der Rückstand nochmals mit Alkohol extrahiert. Von den aus der alkoholischen Lösung ausgeschiedenen Krystallen wurde ein Teil zu einer Schwefelsäurebestimmung verwandt. Diese ergab:  $\text{SO}_4$ : gefunden 38,9%, berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_6\text{NSO}_4\text{K}$  38,2%. Die Krystalle bestanden also aus reinem indoxylschwefelsaurem Kalium. Dieses ist also als indigobildende Substanz des menschlichen Urins sicher festgestellt.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 35, S. 327.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 38, S. 182.