

Ein roter Farbstoff im Harn.

Von

Dr. L. de Jager zu Stiens (Niederland).

(Der Redaktion zugegangen am 14. Dezember 1909.)

I.

Wenn man Harn mit Salzsäure und Formaldehyd versetzt, so entsteht bald ein Niederschlag. Dieser Niederschlag besteht aus einer Verbindung von Formaldehyd und Harnstoff, indem sich zwei Moleküle Harnstoff mit drei Molekülen Formaldehyd unter Austritt von zwei Molekülen Wasser vereinigen. Die Existenz dieser Verbindung ist zuerst von Goldschmidt¹⁾ festgestellt worden. Einige Jahre später hat May²⁾ dieselbe eingehend beschrieben.

Ich kann der Beschreibung, welche May von dieser Verbindung gibt, beipflichten, nur möchte ich dieselbe in einigen Teilen ergänzen.

Der Formaldehydharnstoff besteht aus radiär gestreiften Kugeln. Zum Teil haftet er fest an dem Glas, zum Teil bildet er ein schillerndes Häutchen an der Oberfläche. Der Körper ist in allen bekannten Lösungsmitteln unlöslich. Nach May wird er von starken Säuren gelöst, aber unter Zersetzung. Beim Erhitzen mit 25%iger Schwefelsäure tritt deutlicher Formaldehydgeruch auf.

Auch mir gelang es nicht, die Verbindung in Lösung zu bringen, weder durch Alkohol und Äther, noch durch Benzol, Chloroform, Amylalkohol usw.

Doch gelingt es leicht, die Verbindung in konzentrierter Salzsäure zu lösen. Zwar kann dabei eine teilweise Zersetzung

¹⁾ Bericht der chem. Gesellsch., Bd. XXIX, 1896.

²⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 1900.

auftreten, doch trifft dieses nicht für die ganze Menge zu. Fügt man, nachdem der Körper in Lösung gegangen ist, wobei eine leichte Erwärmung erforderlich ist, Wasser hinzu, so bleibt die Lösung klar. Nach kurzer Zeit aber scheidet sich die Verbindung wieder in denselben Kugeln aus. Auch in verdünnter Salzsäure ist die Verbindung nach längerem Kochen löslich, scheidet sich aber ebenfalls wieder aus. Setzt man zu einer Lösung in konzentrierter Salzsäure Alkohol hinzu, so bleibt die Lösung längere Zeit klar, aber auch diese Lösung ist nicht beständig. Dasselbe ist der Fall, wenn man in heißem salzsauren Alkohol löst.

Schwefelsäure und noch mehr Salpetersäure zersetzt die Verbindung.

Es gelang mir ebenso wenig wie May, aus derselben Harnstoff wieder zu gewinnen.

Nach Huppert¹⁾ sollte die Fällung quantitativ sein. May fand aber im Harn nach Mörner-Sjöqvist 13,53 g N, im Formaldehydniederschlag nur 1,87 g N.

Diese Zahl ist entschieden zu niedrig. Um eine maximale Fällung zu bekommen, muß man eine gewisse Menge Formaldehyd und Salzsäure zusetzen. Mit einer größeren Menge beider Stoffe wird der Niederschlag geringer oder bleibt gänzlich aus.

May teilt Tabellen mit, in denen die Reihenfolge, in welcher die Trübung auftritt, angegeben ist.

Diese Reihenfolge ist aber ebenso wenig wie die Dicke des Niederschlags ein Maß für die Menge des letzteren. Ich versetzte 10 ccm einer 1%igen Lösung von Harnstoff mit wechselnden Mengen Formalin und Salzsäure. Späterhin erwies sich zwar, daß der benutzte Harnstoff 5% Wasser enthielt; dieses tut wenig zur Sache.

Die Lösung blieb klar, wenn $\frac{2}{3}$ ccm Formalin und 1 ccm Salzsäure hinzugesetzt war, ebenso bei einem Zusatz von 1 ccm Formalin und $\frac{2}{3}$ ccm HCl und 1 ccm Formalin und 1 ccm HCl. (Das Formalin enthält 40% Formaldehyd, die Salzsäure 25% HCl.)

¹⁾ Huppert-Neubauer, Harnanalyse, 3. Auflage.

Mit geringeren Mengen bekam ich immer eine Fällung, wenn auch erst nach längerem Zuwarten.

Ebenso wie May fand ich, daß ein Überschuß von Salzsäure weniger schadet als ein Zuviel an Formaldehyd.

Ich setzte nun zu je 10 ccm einer 1%igen Harnstofflösung wechselnde Menge Formalin und HCl, filtrierte nach 24 Stunden durch ein gewogenes Filter, trocknete bei gelinder Wärme und bestimmte das Gewicht des Niederschlags. Dieser haftet stark an dem Glas, sodaß, obwohl ich denselben so viel wie nur möglich war, mit einem Glasstab abkratzte, einiger Verlust unvermeidlich war.

Tabelle I.

Je 10 ccm Harnstofflösung wurden versetzt mit	Gewicht des Nieder- schlags in mg
1 ccm HCl und 220 mg Formalin	57
1 » » » 330 » »	53
1 » » » 440 » »	32
1,5 » » » 220 » »	42
1,5 » » » 330 » »	37
1,5 » » » 440 » »	21
2 » » » 220 » »	45
2 » » » 330 » »	25
2 » » » 440 » »	24

Es geht aus dieser Tabelle hervor, daß eine maximale Fällung zustande kommt mit 200—300 mg Formalin und 1 ccm HCl, d. h. 3—4 Moleküle Formalin auf 6 Moleküle HCl.

Aus 95 mg Harnstoff kann sich 137,75 mg $C_5H_{10}N_4O_3$ bilden. Ich fand höchstens 57 mg, d. h. 41,3%. Zwar ist die Fällung bei weitem nicht quantitativ, wie Huppert angibt, aber sie ist doch viel größer, als May fand. Vielleicht wird die Ausbeute mit einer geringeren Menge HCl größer sein. Ich habe diese aber mit reinen Lösungen nicht weiter bestimmt, weil eine vollständige Fällung doch nicht erfolgt.

Ich wiederholte den Versuch mit Harn.

Tabelle II.

Je 10 ccm Harn werden versetzt mit	Gewicht des Niederschlags in mg
0,5 ccm HCl + 220 mg Formalin	115
0,5 „ „ + 440 „ „	100
0,5 „ „ + 660 „ „	65
1,0 „ „ + 220 „ „	121
1,0 „ „ + 440 „ „	77
1,0 „ „ + 660 „ „	38
1,5 „ „ + 220 „ „	90
1,5 „ „ + 440 „ „	59
1,5 „ „ + 660 „ „	38

Auch hier ist die Menge Salzsäure und Formalin zur maximalen Fällung dieselbe wie im ersten Versuch. Von einer quantitativen Fällung ist nicht die Rede. Die Harnmenge betrug 1640 ccm, die höchstgefundene Zahl 121 mg würde einen Gehalt von 13,678 g Harnstoff ergeben.

Ein dritter Versuch mit Harn, wobei je 0,2, 0,4 und 0,6 ccm HCl und 110, 220 und 330 mg Formalin hinzugesetzt wurden, ergab denselben Erfolg. Das Gewicht des Niederschlags war am höchsten mit 220 mg Formalin zu 10 ccm Harn, die Menge HCl übte wenig Einfluß. In den drei Proben mit 220 mg Formalin fand ich resp. 108, 108 und 105 mg.

Zur maximalen Fällung ist also erforderlich zu 10 ccm Harn 0,5 bis 1 ccm HCl und \pm 0,25 ccm Formalin.

Ich benutzte zu meinen weiteren Versuchen eine Lösung, welche in 1 ccm 0,25 ccm Formalin und 0,5 ccm Salzsäure enthält, d. h. ungefähr molekulares Verhältnis.

Ich bestimmte an einigen Tagen auf diese Weise den Gehalt des Tagesurins an präzipitierbarem Harnstoff in 2 Proben zu je 20 ccm Harn. Die beiden Proben geben immer gut übereinstimmende Zahlen (z. B. 249 und 253 mg, 330 und 335 mg, 390 und 391 mg). Im Tagesharn fand ich an 9 Tagen 18,040, 21,038, 18,759, 18,998, 17,952, 22,610, 21,188, 22,649, 19,296 g, im Mittel 20,089 g, entsprechend 13,84 g Harnstoff. Vielleicht

könnte diese Fällung zu quantitativer Bestimmung brauchbar gemacht werden.

Die verbrauchte Menge Formalin in obigen Versuchen, d. h. 220 mg enthält \pm 90 mg Formaldehyd, welche Menge 174 mg $C_5H_{10}N_4O_3$ entspricht. Es müßte also die Menge des Niederschlags größer sein, wenn alles Formaldehyd mit Harnstoff in Verbindung treten würde. Doch tritt jedenfalls der weitaus größere Teil des Formaldehyds in diese Verbindung ein. Dies Resultat scheint befremdend.

Die Formoltitrierung zur Bestimmung des Ammoniaks beruht auf der Bildung von Hexamethylentetramin, wobei man annimmt, daß durch den Formaldehyd die Ammoniakverbindungen zersetzt werden. Ebenso wird von den Aminosäuren Formaldehyd in Anspruch genommen. Doch bildet sich bei Anwesenheit von Salzsäure Formaldehydharnstoff. In einer Probe eines mit Ammoniumsulfat gesättigten Harns entstand nach Zusatz von Formalin und Salzsäure ein Niederschlag, wie in normalem Harn. Daraus geht hervor, daß Ammoniakverbindungen nicht durch den Formaldehyd zersetzt worden sind, sondern daß erst durch Alkali das Ammoniak in Freiheit versetzt werden muß, bevor es mit dem Formaldehyd eine Verbindung eingehen kann. Letzteres läßt sich übrigens leicht beweisen. Eine Lösung von Salmiak wurde mit wenig Formalin versetzt, und nach kurzer Zeit Harnstoff und Salzsäure hinzugesetzt. Es entsteht ein Niederschlag. Also hat sich keine Verbindung von Formaldehyd mit Ammoniak gebildet, denn eine Harnstofflösung wird von Urotropin (Hexamethylentetramin) und Salzsäure nicht gefällt.

Aus diesem Versuch geht fernerhin hervor, daß die Wirkung von Urotropin auf die Harnorgane nicht die Folge einer Abspaltung von Formaldehyd sein kann. Wäre dies der Fall, so müßte der abgespaltene Formaldehyd eine Verbindung mit Harnstoff bilden, vorausgesetzt, daß diese Abspaltung im Harn Platz greifen würde. Eine Bildung von Formaldehyd in den harnbildenden Organen ist zwar möglich, nicht aber eine antiseptische Wirkung des Formaldehyds auf den Harn.

Der Niederschlag enthält keine Harnsäure, während dieser

Körper von Salzsäure allein zum Teil gefällt wird. Zu einer Lösung von Harnsäure in Natronlauge setzte ich Salzsäure, wobei sogleich ein Niederschlag entstand. Wenn zu der Uratlösung Formalin zugegeben wird, so bleibt die Lösung nach Salzsäurezusatz klar. Indes gelang es mir nicht, durch nachherigen Zusatz von Formalin die durch Salzsäure gefällte Harnsäure wieder zu lösen.

II.

Von May wird der aus Harn erhaltene Körper beschrieben als ein feines, schwachgelbliches Pulver.

Dieses trifft zu, wenn man den Niederschlag nach der von May angegebenen Methode behandelt. Es wird dieser Niederschlag nacheinander ausgewaschen mit heißem Wasser, Salzsäure, Natronlauge, heißem Wasser, Alkohol, Äther und auf dem Wasserbad getrocknet.

Wenn man so verfährt, erhält man ein gelbliches Pulver.

Doch enthält dieses Pulver einen Farbstoff, welcher von May nicht gefunden zu sein scheint.

Es ist bekannt, daß Harn nach Zusatz von Salzsäure nach einiger Zeit eine mehr oder weniger rote Farbe annimmt. Versetzt man Harn mit Formalin und Salzsäure, so wird er bald rot. Nicht jeder Harn zeigt diese Erscheinung deutlich, doch ist der Farbstoff immer anwesend.

Ein von mir untersuchter Harn, welcher die Erscheinung sehr deutlich zeigt, war nach Zusatz von je 5% Salzsäure und Formalin in 5 Minuten hochrot, nach 10 Minuten zeigte sich eine Trübung. Der Farbstoff wird von dem Formalinharnstoff niedrigerissen. Ob der Farbstoff selbst gefällt wird, habe ich nicht feststellen können, weil es auf keine Weise gelingt, denselben von dem Harnstoffniederschlag zu trennen. Doch ist es mir wahrscheinlich, daß der Farbstoff selbst unlöslich ist.

Der Formaldehydharnstoff, wie er aus Harn gewonnen wird, stellt ein gelbes bis ziegelrotes Pulver dar. Die Farbe ist abhängig von der Menge der im Harn enthaltenen Chromogene und zweitens von der Zeit der Einwirkung. Der Farbstoff wird schneller gefällt als der Harnstoff. Ob letzterer den

Farbstoff mechanisch mitreißt oder ob man mit zwei Fällungen zu tun hat, lasse ich dahingestellt, aber man kann den Farbstoff konzentrieren, wenn bald filtriert wird.

Ich versetzte 200 ccm Harn mit je 12,5 ccm Formalin und Salzsäure; nach 10 Minuten, sobald der Harn anfang sich zu trüben, wurde filtriert. Das rote Filtrat trübte sich sofort wieder; der zweite Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat nach 24 Stunden nochmals filtriert. Der erstentstandene Niederschlag ist lebhaft rot, der zweite und dritte orange-farben.

Ich versetzte drei Proben Harn aus je 250 ccm mit 12,5 ccm Salzsäure und resp. 3,0, 6,20 und 12,5 ccm Formalin. Letztere Probe fing zuerst an sich zu trüben. Sobald die erste Trübung sichtbar war, wurde filtriert. Der Niederschlag aus der ersten Probe mit 3 ccm Formalin war violettrot, aus der zweiten mit 6,20 ccm Formalin karminrot, aus der dritten mit 12,5 ccm Formalin ziegelrot. Die Ausbeute betrug umgekehrt resp. 0,250, 1,070 und 2,050 g.

Werden Reagenzröhren benutzt, so ist der untere Teil des Niederschlags rot und der obere Teil fast weiß.

Der rote Niederschlag zeigt dieselben Eigenschaften Lösungsmitteln gegenüber wie reiner Formaldehydharnstoff.

Die Lösung gelang nur in Mineralsäuren. In konzentrierter Salzsäure löst sich der Farbstoff bei gelinder Erwärmung leicht, und die Lösung kann mit Wasser oder Alkohol verdünnt werden. Doch scheidet sich der Körper nach einiger Zeit wieder aus; aus der wässrigen Lösung sehr bald, während die alkoholische Lösung beständiger ist. Durch Zusatz von Wasser wird diese Lösung trübe. Weniger leicht gelingt die Lösung in mit Wasser oder Alkohol verdünnter Salzsäure. Konzentrierte Schwefelsäure löst den Farbstoff auch, es tritt dabei aber eine Zersetzung auf, indem die Lösung beim Erwärmen schwarz wird; nach Zusatz von Alkohol entsteht eine bläulich-rote Lösung.

In Salpetersäure löst sich der Farbstoff mit gelber Farbe, nach Zusatz von Kali- oder Natronlauge wird die Farbe orange-farben bis braun.

Durch Alkalien oder Ammoniak wird die Farbe gelblich, bei Zusatz von Säure kehrt die rote Farbe wieder zurück. Da May den Niederschlag zuletzt mit Natronlauge behandelt, ist es verständlich, daß das von ihm erhaltene Pulver eine gelbliche Farbe besessen hat.

Wird das rote Pulver mit Natronlauge während längerer Zeit gekocht, so bekommt man eine braune Lösung, welche durch Säurezusatz nicht wieder rot wird. Der ungelöst gebliebene Rest wird aber durch Säurezusatz wieder rot.

Nicht aus jedem Harn gelingt es, ein deutlich rotes Produkt zu bekommen. Doch kommt beim Lösen in Salzsäure die rote Farbe immer zum Vorschein. Der Farbstoff ist sehr beständig.

Die salzsaure alkoholische Lösung wurde mit Chloroform, Äther, Benzol, Amylalkohol, Essigäther usw. behandelt. Keines dieser Lösungsmittel löste den Farbstoff im geringsten.

Die Lösung in salzsaurem Alkohol verdunkelt das violette Ende des Spektrums bis an das Gelb, in größerer Verdünnung tritt ein Absorptionsstreifen auf, welcher den Raum von Linie b bis F einnimmt. Dieser Absorptionsstreifen kommt überein mit dem Absorptionsstreifen, welchen Arnold¹⁾ angibt für das von ihm beschriebene Nephrosein, wenn zugleich Urobilin anwesend ist.

Der beschriebene Farbstoff ist im Harn nicht als solcher anwesend, sondern muß entweder ein Zersetzungsprodukt oder eine Formolverbindung eines präformierten Körpers sein. Als Muttersubstanz kommen in Betracht Indol, Skatol, Urochrom, Urobilin und Urorein. Letzterer Körper soll nach Porcher und Hervieux²⁾ identisch sein mit Skatolrot, ebenso wie mehrere andere rote Harnfarbstoffe (Uroerythrin, Purpurin, Uromelanin usw.).

Ich sättigte nach den Angaben Garrods³⁾ ein Quantum Harn mit Ammoniumsulfat und setzte absoluten Alkohol zu dem klaren Filtrat. Es gelang mir nicht, diese Lösung von Urochrom durch Lösen in Wasser und Sättigen mit Ammonium-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXI.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLV.

³⁾ Nach Huppert-Neubauer, Harnanalyse, 3. Aufl.

sulfat weiter zu reinigen. Der Niederschlag enthält neben Urobilin noch Uroerythrin und Hämatoporphyrin. Die alkoholische Lösung desselben wird nach Salzsäurezusatz rot; wird zugleich Formalin zugesetzt, so bleibt die Farbe dieselbe.

Die alkoholische Urochromlösung wird ebenfalls durch Salzsäurezusatz rot, aber erst nach einiger Zeit. Zusatz von Formalin und Salzsäure ruft fast sofort eine rote Farbe hervor, und nach einiger Zeit setzt sich ein dunkelroter Niederschlag ab. Dieser besteht aus kleinen Kugeln, zumeist mehreren aneinander gereiht, wodurch ein Bild entsteht, das an Blutkoralle erinnert. Diese Lösung enthält also noch Harnstoff. Um diesen zu entfernen, setzte ich Oxalsäure hinzu, konzentrierte die Lösung durch Erwärmen und filtrierte nach einiger Zeit. Die jetzt braune Lösung wurde versetzt mit Formalin und Salzsäure, wodurch nach einiger Zeit ein rotbrauner Niederschlag entstand, welcher dieselben Eigenschaften zeigte wie der aus Harn gewonnene. Nur war die salzsaure Lösung weniger lebhaft rot. Offenbar bestand der Niederschlag noch zum Teil aus Formylharnstoff. Zum gelbbraunen Filtrat setzte ich Harnstoff. Der dadurch entstandene Niederschlag war gelblich, die Lösung desselben in Salzsäure ist gelb. Doch bleibt noch immer das Filtrat gefärbt.

Die Muttersubstanz ist also enthalten in der nach Garrod bereiteten Urochromlösung. Die Formylverbindung ist im Gegensatz zu dem Urochrom von Garrod nicht im geringsten hygroskopisch, ist unlöslich in Wasser und Weingeist; Bleiacetate oder Silbernitrat entfärben die Lösung in salzsaurem Alkohol nicht. Dagegen gibt dieselbe ebenso wie das Urochrom die Xanthoproteinreaktion. Der Absorptionsstreifen im Spektrum beweist aber, daß noch eine andere Verbindung anwesend ist. Nach Garrod zeigt zwar eine reine Urochromlösung nach Erhitzen mit Aldehyd den Urobilinstreifen. Nach Dombrowski¹⁾ liegt aber die Ursache im inaktiven Urobilin, das durch das Aldehyd aktiviert wird. Das von letzterem dargestellte Urochrom zeigte keine Farbenänderung weder durch Mineralsäuren noch durch Alkalien.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV.

Obwohl das Spektrum einen Absorptionsstreifen zeigt, welcher fast mit dem Urobilinstreifen zusammenfällt, scheint mir doch der Farbstoff dem Urobilin nicht zu entstammen. Es wird die Bildung der roten Farbe zwar sehr beschleunigt durch Formaldehyd, doch entsteht dieselbe auch durch Salzsäure allein, wenn auch erst nach längerer Zeit. Versetzt man Harn mit Salzsäure, so wird, wenn derselbe nach 24 Stunden rotgefärbt erscheint, der Farbstoff mitsamt dem Harnstoff sofort von Formalin gefällt.

Das Spektrum des Skatolrot, wie es von Porcher und Hervieux¹⁾ und von Staal²⁾ angegeben wird, ist ein ganz anderes. Ob der Farbstoff identisch ist mit dem Nephrorosein Arnolds, lasse ich dahingestellt.

Einer gepaarten Schwefelsäureverbindung entstammt der Farbstoff nicht. Es müßte dann aus dieser Verbindung auch durch die Salzsäure die Schwefelsäure abgespalten werden. Ich versetzte zwei Proben Harn, die eine mit Salzsäure, die andere mit Formalin und Salzsäure, filtrierte nach 24 Stunden und setzte Baryumchlorid hinzu. In beiden Proben wurde die nämliche Menge Baryumsulfat gefällt.

Jedenfalls scheint die Muttersubstanz des Farbstoffs in jedem Harn anwesend zu sein. Der Farbstoff fällt zugleich mit dem Formylharnstoff aus, auch wenn der Niederschlag nicht die rote Farbe zeigt. Unter welchen Umständen die Farbe mehr oder weniger rot erscheint, ist mir bis jetzt nicht gelungen zu erforschen. Eine deutliche Rotfärbung kommt bei vollkommen normalem Harn vor und zwar, wie mir scheint, bei demselben Individuum immer mit derselben Intensität.

Zum Schluß noch eine praktische Bemerkung. Der Formalniederschlag haftet so fest an dem Glase, daß derselbe mechanisch nicht zu entfernen ist, sondern mit heißer konzentrierter Salzsäure oder noch besser Schwefelsäure gelöst werden muß.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLV.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI.