

Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Indikans im Harn.

Von

Adolf Jolles.

(Aus dem chemischen Laboratorium von Dr. M. und Prof. Ad. Jolles in Wien.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. April 1915.)

In Band 87 (1913) dieser Zeitschrift habe ich in einer vorläufigen Mitteilung eine neue Indikanreaktion beschrieben, für welche ich folgende Vorschrift gab:

«10 ccm Harn werden mit 2 ccm einer 20%igen Bleizuckerlösung versetzt, umgeschüttelt und klar filtriert. Zum Filtrate setzt man $\frac{1}{2}$ ccm einer 10%igen alkoholischen Thymolösung, 10 ccm einer eisenchloridhaltigen Salzsäure (Obermayers Reagens) und 4 ccm Chloroform hinzu und schüttelt das ganze gut durch, worauf bei Anwesenheit selbst der geringsten Spuren von Indikan das Chloroform eine schöne violette Färbung zeigt.»

Ich habe mir in der vorläufigen Mitteilung vorbehalten, den Mechanismus dieser Reaktion aufzuklären. Es ist mir inzwischen gelungen, die Konstitution des violetten Farbstoffes zu ergründen und ich habe darüber kürzlich in einer der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien vorgelegten Abhandlung «Über ein neues Indoxylderivat» berichtet.¹⁾

Da aus Thymol allein bei der Einwirkung von Eisenchlorid in stark saurer Lösung keine gefärbte Substanz entsteht, so kann die Violettfärbung bei der oben beschriebenen Reaktion nur von der gemeinsamen Oxydation des Indoxyls und Thymols herrühren. Es ist nun durch die Untersuchungen P. Friedländers²⁾ festgestellt, daß sich Indoxyl mit Phenolen

¹⁾ Mathem.-naturw. Klasse, Abteilung II^b, 124. Band, 1915.

²⁾ Monatsh. f. Chemie, Bd. 29, S. 359, 375, 387; Bd. 80; S. 271.

zu «Zweikernchinonen» vereinigt, die entweder dem indigoiden Typus oder dem isomeren indolignoiden angehören. Es lag nahe, die Bildung ähnlicher Körper bei der von mir beschriebenen Reaktion des Indikans zu vermuten.

Die Isolierung des Reaktionsproduktes bereitete anfänglich infolge der Verunreinigungen der technischen Indoxylsäure große Schwierigkeiten. Dagegen gelingt die Darstellung gut nach folgender Vorschrift:

30 g Indoxylsäure¹⁾ wurden mehrere Male mit Wasser ausgekocht, in welchem sich das Indoxyl, nicht aber die harzigen Verunreinigungen der technischen Indoxylsäure lösen, die Lösungen heiß filtriert und zu den gesammelten Filtraten so viel Eisessig hinzugefügt, daß das in der Kälte aus der wässerigen Lösung als gelbes Öl abgeschiedene Indoxyl wieder in Lösung ging. Hierzu wurde nun eine Lösung von 25 g Thymol in Eisessig gefügt und das Gemisch unter gutem Rühren in überschüssige Eisenchloridsalzsäure (enthaltend 110 g Ferrichlorid) eingetragen. Das Ganze wurde hierauf unter Rühren in konzentrierte Sodalösung eingegossen, wobei sich eine rotbraune Masse abschied. Diese wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet, hierauf zur Entfernung des überschüssigen, d. h. nicht in Reaktion getretenen Thymols mit Petroläther ausgezogen und schließlich zur Trennung des Farbstoffes vom Ferrihydroxyd mit Äther im Soxhlet extrahiert. Der aus der ätherischen Lösung durch Abdunsten gewonnene Farbstoff wurde schließlich 2 mal aus Nitrobenzol umkrystallisiert und dabei in Form schöner roter Prismen mit aufgesetzten Pyramiden erhalten. Die Substanz schmilzt bei 218—220° unter gleichzeitiger Zersetzung und ist in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln mit roter bis braunroter Farbe löslich (sehr verdünnte Lösungen zeigen eine braune bis bräunlichgelbe Färbung). Bei Zusatz von Salzsäure schlägt die rote oder braunrote Farbe der Lösungen in violett um. Wird die Salzsäure ausgewaschen oder neutralisiert so kehrt die ur-

¹⁾ Für die mir freundlichst zur Verfügung gestellten Präparate sei der Direktion der Badischen Anilin- und Sodafabrik auch an dieser Stelle der verbindlichste Dank ausgesprochen.

sprüngliche Farbe wieder. Auch in Alkalilauge ist die Substanz und zwar mit schwach gelber Farbe löslich und kann, wenn die Lösung nicht erhitzt wurde, durch Ansäuern wieder ausgefällt werden. Beim Erhitzen der alkalischen Lösung erfolgt Spaltung.

0,2107 g Substanz gaben 0,5950 g CO₂ und 0,1149 g H₂O.

0,3985 g „ „ 18,0 ccm N bei 15° C. und 756 mm B.

Berechnet für $C_{18}H_{17}NO_9$:

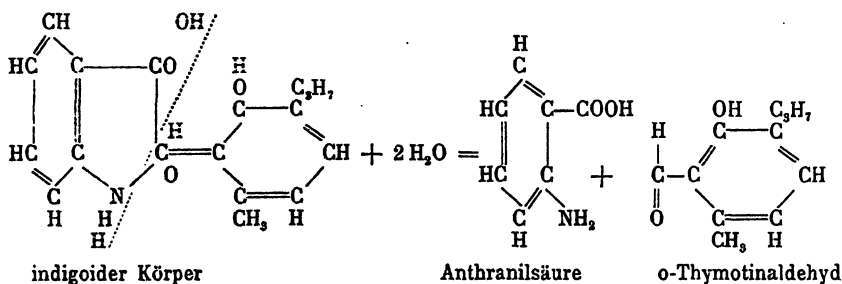
Gefunden:

C = 77,38 %

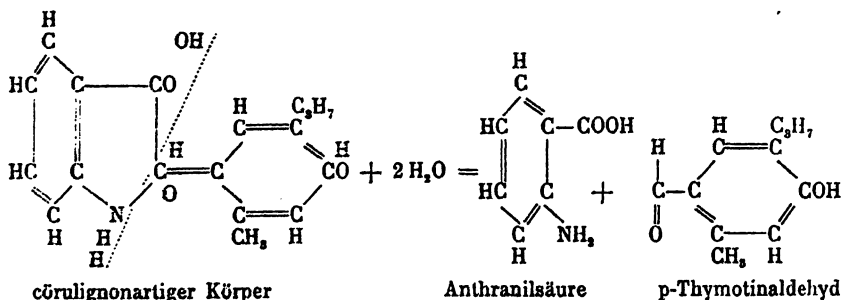
C = 77,01 %

$$\text{H} = 6,14\%$$
$$H = 6,10\%$$
$$N = 5,02\%$$
$$N = 5,25 \%$$

Zur Entscheidung der Frage, ob dem gewonnenen Stoffe die indigoide oder die cörlignonartige Struktur zukommt, wurde die von Friedländer angegebene Alkalisplaltung vorgenommen, bei welcher der indigoide Körper nach der Gleichung:



in Anthranilsäure und o-Thymotinaldehyd, der cörulignonartige Körper nach der Gleichung:



in Anthranilsäure und p-Thymotinaldehyd zerfallen müßte.

2 g Substanz wurden mit 20 g 10%iger Natronlauge so lange gekocht, bis beim Ansäuern einer Probe keine Rückbildung des Farbstoffes mehr eintrat, und hierauf die gesamte Reaktionsmasse mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt, wobei sich eine braungelbe amorphe Masse abschied. Im Filtrate konnte zwar die Anthranilsäure nachgewiesen werden, jedoch gelang es nicht, aus dem Rückstande das andere Spaltprodukt rein zu gewinnen. Trotzdem glaube ich mit Sicherheit annehmen zu können, daß nicht ortho-, sondern para-Thymotinaldehyd als 2. Spaltungsprodukt auftrat, da in dem wasserunlöslichen Anteil der angesäuerten Spaltmasse kein mit Wasserdämpfen flüchtiges Produkt enthalten war, der o-Thymotinaldehyd aber, wie jeder aromatische Ortho-Oxyaldehyd mit Wasserdämpfen flüchtig sein muß. Auf Grund dieser Überlegung müßte also dem durch gemeinsame Oxydation von Thymol und Indoxyl mittels Ferrichlorid dargestellten Produkte die cörulignonartige Struktur und mithin nach Friedländers Nomenklatur die Bezeichnung 4-Cymol-2-indolindolignon beigelegt werden, was noch dadurch gestützt wird, daß die Substanz keinerlei tinktoriellen Charakter zeigt, d. h. weder zur ungebeizten noch zur gebeizten tierischen oder pflanzlichen Faser irgendwelche Affinität besitzt, ein Verhalten, welches bei einem Körper von indigoider Struktur kaum möglich erscheint.

Darstellung des salzsauren Salzes des Indolignons.

Eine Quantität der reinen Substanz wurde in trockenem Äther gelöst, mit trockenem HCl-Gas gesättigt und der ausgefallene braunschwarze, samtartige Niederschlag, der unter dem Mikroskop deutlich Nadeln erkennen ließ, isoliert. Bei der Analyse konnte festgestellt werden, daß das entstandene Salz ein Molekül HCl enthält. Es ist interessant, daß die Substanz, wie ihre Löslichkeit in Alkalien beweist, auch schwach saure Eigenschaften hat; beide Erscheinungen sind ja auch bei den indigoiden Farbstoffen beobachtet worden.

0,0738 g im Schwefelsäureexsikkator getrocknete Substanz lieferten
0,0322 g AgCl daher

Berechnet: 11,24 % Cl.

Gefunden: 10,80 % Cl.

Qualitativer Nachweis des Indikans im Harne.

Die hervorstechendste Eigenschaft des bei der gemeinsamen Oxydation von Thymol und Indoxyl entstehenden 4-Cymol-2-indolindolignons ist seine Fähigkeit, mit 1 Molekül Säure Salze zu bilden, die eine tiefviolette Farbe zeigen. Dies ist auch die Ursache der Färbung der Chloroformauszüge bei der von mir vorgeschlagenen Indikanreaktion. Behandelt man die Chloroformlösung mit Wasser, so wird entsprechend der größeren Löslichkeit der Salzsäure in Wasser diese dem Chloroform entzogen, das Salz des Indolignons hydrolytisch gespalten und die violette Farbe des Chlorhydrats schlägt in die rotbraune des Indolignons um. Auf Grund der gemachten Erfahrungen habe ich die seiner Zeit von mir in Vorschlag gebrachte qualitative Reaktion dahin modifiziert, daß ich einerseits eine konzentriertere eisenchloridhaltige Salzsäure hinzufüge, anderseits nach Zusatz des Thymols und des Oxydationsgemisches zu dem Harne etwa 15—20 Minuten unter wiederholtem Umschütteln stehen lasse. Die Bildung des Indolignons geht verhältnismäßig langsam vor sich und wenn man daher sofort mit Chloroform extrahiert, so entzieht man der Flüssigkeit das Thymol und die Oxydation führt auch teilweise zum gewöhnlichen Indigo. Ferner wird die Bildung des Indolignons durch Zusatz einer konzentrierteren Lösung des Oxydationsgemisches beschleunigt. Die qualitative Reaktion zum Nachweis von Indikan im Harne gestaltet sich daher am besten, wie folgt:

Man versetzt ca. 10 ccm Harn mit 1 ccm einer 5%igen alkoholischen Thymollösung und schüttelt um. Hierauf fügt man etwa 10 ccm einer rauchenden Salzsäure hinzu, welche 5 g Eisenchlorid pro Liter enthält, schüttelt nochmals sorgfältig um und läßt ca. 15 Minuten stehen. Nachher fügt man ca. 4 ccm Chloroform hinzu und extrahiert durch wiederholtes sanftes Schütteln den Farbstoff, wobei sich das Chloroform je nach dem Gehalt des Harns an Indikan mehr oder weniger intensiv violett färbt.

Die Probe ist außerordentlich empfindlich, denn sie gestattet in 10 ccm Harn noch 0,0032 mg Indikan nach-

zuweisen, während die bekannte Obermayersche Reaktion bei Vorhandensein von 0,013 mg Indikan in 10 ccm Harn ein vollkommen negatives Resultat lieferte. Meine Probe ist somit *ceteris paribus* etwa viermal so empfindlich als die Obermayersche Reaktion.

Quantitative Bestimmung des Indikans im Harne.

Der Umstand, daß bei der Thymol-Reaktion nur ein Produkt resultiert, während alle Methoden, welche auf der Oxydation des «Indikans» zu Indigo beruhen, stets zu Lösungen führen, welche durch größere oder geringere Mengen von Indigrot und Indigbraun verunreinigt sind, legte den Gedanken nahe, die Thymol-Probe zu einer quantitativen (kolorimetrischen) Bestimmung des indoxylschwefelsauren Kaliums zu verwenden. Für eine kolorimetrische Verwendung des Indolignons standen zwei Wege offen.

Man konnte entweder die violette Chloroformlösung, also das salzsaure Salz des Indolignons nehmen, oder aber man mußte der Chloroformausschüttelung die Salzsäure entziehen und die rotbraune Lösung des Indolignons verwenden. Beide Wege habe ich versucht und bei Einhaltung der gebotenen Vorsichtsmaßregeln gangbar befunden.

Die Methode, die sich des salzsauren Salzes bedient, erwies sich aber als nicht immer gleich zuverlässig und zwar deshalb, weil sich eine Beimengung von Wasser zur Chloroformlösung manchmal nur schwer vermeiden läßt. Es tritt dann aber leicht die erwähnte hydrolytische Spaltung ein und damit auch die Bildung von Zwischenfarben.

Hingegen hat sich folgendes Verfahren gut bewährt:

10 ccm der entsprechend verdünnten Indikanlösung werden im Schütteltrichter mit 1 ccm einer 5%igen Thymollösung gut vermischt, worauf man die gleiche Menge, also 10 ccm, einer rauchenden Salzsäure zusetzt, welche pro Liter 5 g Eisenchlorid enthält. Nach gründlichem Schütteln läßt man zum Zwecke vollständiger Bildung des Indolignons 2 Stunden stehen. Nachher extrahiert man die Flüssigkeit mit je 5 ccm reinem Chloroform und zwar so oft, bis die letzte Ausschüttelung

farblos erscheint. Die einzelnen Chloroformextrakte werden in einem zweiten Schütteltrichter aufgefangen und hier mit destilliertem Wasser geschüttelt. Hierbei nimmt die ursprünglich violett gefärbte Chloroformlösung einen rotbraunen Farbenton an. Zur weiteren Reinigung läßt man hierauf die Chloroformlösung in den ersten Trichter ab, der inzwischen gereinigt und mit sehr verdünntem Alkali (ca. $n/500$ bis $n/1000$) beschickt worden war.

Das Waschwasser im anderen Schütteltrichter extrahiert man noch mit einigen Kubikzentimetern Chloroform, die man dann ebenfalls in den Schütteltrichter mit dem Alkali bringt. Hierauf wäscht man in der gleichen Weise noch einmal mit destilliertem Wasser und läßt nunmehr die Chloroformlösung in ein Kölbchen ab, in welchem sich die mitgerissenen Wassertropfen bei ca. 2stündigem Stehen absetzen, worauf man an die eigentliche kolorimetrische Bestimmung gehen kann.

Man bereitet sich eine Standardlösung aus synthetisch gewonnenem 4-Cymol-2-Indolindolignon, indem man 0,01 g Substanz in 100 ccm Chloroform auflöst. Von dieser Stammlösung werden 5 ccm mit Chloroform auf 50 ccm verdünnt und mit der so erhaltenen Lösung die Chloroformausschüttelung aus der Indikanlösung im Kolorimeter verglichen.

1 ccm der Vergleichslösung entspricht 0,01 mg Indolignon, entsprechend 0,0090 mg Indikan.

Zur kolorimetrischen Bestimmung habe ich einerseits das Wolffsche Kolorimeter benützt, welches Herr Professor G. Goldschmiedt mir gütigst zur Verfügung gestellt hat, andererseits einen Apparat, der nach ähnlichem Prinzip hergestellt war, bei welchem aber der Inhalt der Röhren nur je 15 ccm betrug, was namentlich bei verdünnten Indikanlösungen ein bequemerer Arbeiten ermöglichte.

Die Einzelheiten dieses seinerzeit von mir für die kolorimetrische Eisenbestimmung verwendeten Apparates habe ich bereits im Jahre 1898 eingehend beschrieben.¹⁾

¹⁾ Wiener mediz. Presse Nr. 5, 1898 und Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 65.

Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, habe ich aus synthetisch gewonnenem Indikan Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt und den Inhalt kolorimetrisch bestimmt.

Darstellung des indoxylschwefelsauren Kaliums (Indikan).

Das für die kolorimetrischen Bestimmungen erforderliche Indikan habe ich nach einem Verfahren dargestellt, welches ich kürzlich in Gemeinschaft mit Erw. Schwenk publiziert habe.¹⁾

Es gelang nach diesem Verfahren ein Präparat mit 97,6% Indikan, wie folgt, darzustellen:

Zuerst wurde durch tropfenweises Eintragen von ca. 20 g Chlorsulfonsäure in viel gut gekühltes Pyridin (ca. 60 g) eine Lösung der Doppelverbindung von Pyridin und Chlorsulfonsäure hergestellt. Zu dieser wurden ca. 6 g N-Acetindoxyl, in sehr wenig Pyridin gelöst, zugegeben und das Gemisch zwei Tage sich selbst überlassen.

Während des Stehens schieden sich aus der Flüssigkeit so viele feine Nadeln ab, daß das Ganze einen dicken Brei bildete. Nach der angegebenen Zeit wurde in einen Fraktionierkolben abgesaugt. Die abgesaugte Flüssigkeit wurde im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur verdampft, um den Pyridinüberschuß möglichst zu entfernen, alsdann das noch gebundene Pyridin mit ca. 30 ccm konzentrierter wässriger Kalilauge in Freiheit gesetzt und durch neuerliche Vakuumdestillation entfernt.

Der mit Wasser verdünnte Rückstand wurde durch Kochen mit reiner Tierkohle gereinigt, filtriert, dann wurde zur Bindung des freien Alkalis in die erhaltene Flüssigkeit längere Zeit Kohlensäure eingeleitet und schließlich abermals im Vakuum möglichst zur Trockene eingedampft. Der noch etwas feuchte Rückstand wurde durch Mischen mit entwässertem Natriumsulfat zur Staubs Trockene gebracht und das Pulver im Soxhlet mit Alkohol (Gemisch von 1 Teil absolutem und 2 Teilen

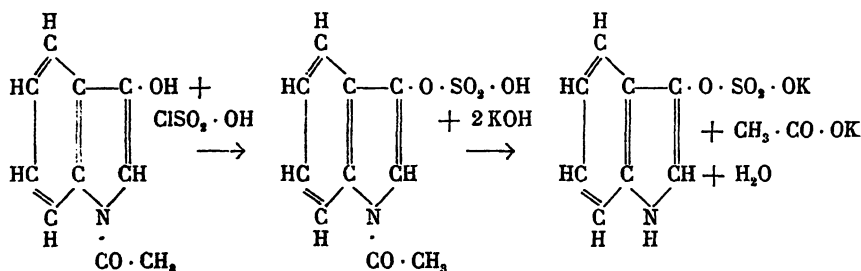
¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 68, S. 347, 1915.

96%igem Alkohol) extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit wurde auf ein geringes Volumen eingedampft, abgekühlt und mit Äther gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Das so erhaltene Rohprodukt wurde nochmals in hochgradigem Alkohol gelöst und wieder mit Äther gefällt. Schließlich wurde mit Wasser aufgenommen, auf dem Wasserbade vorsichtig eingedampft und die erhaltenen Krystalle zuerst auf Ton, dann im Schwefelsäureexsikkator getrocknet. Die so gewonnene Substanz zeigte unter dem Mikroskope schön ausgebildete Blättchen.

Die Ausbeute nach diesem Verfahren ist allerdings gering, es resultierten 0,72 g Indikan.

Der Prozeß verläuft nach folgendem Schema:



In den Reaktionen zeigte die Substanz das bekannte Verhalten, nämlich die leichte Oxydation zu Indigo in saurer Lösung und die Fällung von Schwefelsäure erst nach dem Kochen mit Säure.

Die Schwefelsäurebestimmung ergab folgendes Resultat:

0,2046 g Substanz geben 0,1854 g Baryumsulfat,
daher

gefunden SO_4
37,3%

berechnet für $\text{C}_8\text{H}_6\text{NSO}_4\text{K}$
38,2%

Das erhaltene Präparat enthielt somit 97,6% Indikan.¹⁾

¹⁾ In einer demnächst in der «Biochemischen Zeitschrift» erscheinenden Publikation von Erw. Schwenk und mir wird über eine Verbesserung dieses Verfahrens berichtet, bei der unter Vermeidung der

Kolorimetrische Indikanbestimmung.

Von dem synthetisch gewonnenen Indikan wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung A: 0,1332 g Substanz pro Liter,

„ B: 0,0666 „ „ „ „

Da das verwendete Präparat 97,6% Indikan enthielt, so waren entsprechend im Liter

der Lösung A: 0,1300 g Indikan,

„ „ B: 0,0650 „ „ „ enthalten.

Es wurde in 25 ccm der Lösung B nach der Methode von Ellinger (modifizierte Wang-Obermayersche Methode) der Indikangehalt quantitativ festgestellt und 1,27 mg statt der vorhandenen 1,63 mg gefunden. Wie Ellinger an reinen Indikanlösungen festgestellt hat,¹⁾ gehen bei dieser Methode nur etwa 85—86% des Indoxyls in Indigo über, so daß man mit einem Fehler von ca. 15% rechnen muß. Unter Berücksichtigung dieser 15% sind in 25 ccm der Lösung B nach Ellinger 1,49 mg vorhanden, welcher Wert dem tatsächlich vorhandenen Indikangehalte von 1,63 mg schon nahe kommt.

Aus den Indikanlösungen A und B wurden je 10 und 5 ccm entnommen, die Indikanbestimmung nach der beschriebenen Thymolmethode durchgeführt, und die Chloroformausschüttelungen aus den A-Lösungen auf 50 ccm, aus den B-Lösungen auf 25 ccm aufgefüllt.

Verglichen wurde mit einer Standardlösung von reinem Indolignon, die 0,01 g Substanz, entsprechend 0,009 g Indikan in 100 ccm enthielt, welche Lösung vor dem Gebrauch auf das 10-fache verdünnt wurde.

Extraktion mit Alkohol ein vollkommen reines Produkt in bedeutend größerer Ausbeute erhalten wird.

Von dem bei Zusatz von Kaliumhydroxyd ausfallenden Kaliumsulfat wird abgesaugt und das Filtrat bei möglichst niedriger Temperatur bis auf einen kleinen Flüssigkeitsrest verdunstet. Das sich ausscheidende Indikan wird durch Auskochen mit wenig Wasser von dem noch beigemengten Kaliumchlorid befreit und durch Umkrystallisieren aus heißem Alkohol völlig gereinigt.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 38, S. 178, 1903.

1 ccm dieser verdünnten Lösung entspricht 0,009 mg Indikan.

Versuch I: 10 ccm der Lösung A, Gesamtvolumen, der Chloroformausschüttelungen 50 ccm. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte im Wolffschen Kolorimeter.

Zylinder I enthielt 25 ccm der Standardlösung, entsprechend 0,225 mg Indikan.

Zylinder II 25 ccm der Ausschüttelung. Da letztere stärker gefärbt erschien, als die Standardlösung, wurde von ihr so viel Chloroform abgelassen, bis Farbgleichheit eintrat. Es entsprachen 8 ccm der Ausschüttelung 25 ccm Standardlösung.

Daher gefunden in 10 ccm der Lösung A 1,406 mg, berechnet 1,300 mg Indikan.

Versuch II: 5 ccm der Lösung A, Gesamtvolumen, der Chloroformausschüttelungen 50 ccm.

Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte im Wolffschen Kolorimeter.

Zylinder I enthielt 25 ccm der Standardlösung, entsprechend 0,225 mg Indikan.

Zylinder II 25 ccm der Ausschüttelung. Es entsprachen 17 ccm der Ausschüttelung 25 ccm Standardlösung.

Daher gefunden in 5 ccm der Lösung A 0,662 mg, berechnet 0,650 mg Indikan.

Versuch III: 10 ccm der Lösung B, Gesamtvolumen der Chloroform-Ausschüttelungen 25 ccm. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte in dem kleinen Kolorimeter.

Zylinder I enthielt 15 ccm der Standardlösung, entsprechend 0,135 mg Indikan.

Zylinder II 15 ccm der Ausschüttelung.

Da der Inhalt des Zylinders II stärker gefärbt erschien, als der des Zylinders I, wurde von II so viel Chloroform abgelassen, bis Farbgleichheit eintrat.

Es entsprachen 5,2 ccm des Zylinders II 15 ccm des Zylinders I.

Daher gefunden in 10 ccm der Lösung B 0,6490 mg, berechnet 0,6500 mg Indikan.

Versuch IV. 5 ccm der Lösung B, Gesamtvolumen der

Chloroform-Ausschüttelungen 25 ccm. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte im kleinen Kolorimeter.

Zylinder I enthielt 15 ccm der Standardlösung, entsprechend 0,1350 mg Indikan.

Zylinder II enthielt 15 ccm der Ausschüttelung.

Es entsprachen 15 ccm der Standardlösung 10,3 ccm der Ausschüttelung.

Daher gefunden in 5 ccm der Lösung B 0,3277 mg, berechnet 0,3250 mg Indikan.

In gleicher Weise habe ich in je 8, 6, 4, 2 ccm der Lösungen A und B den Indikangehalt kolorimetrisch bestimmt und lasse nachstehend die Resultate tabellarisch folgen:

Lösung A Anzahl der ccm	Gefunden Indikan in mg	Berechnet Indikan in mg
8	1,120	1,040
6	0,820	0,780
4	0,538	0,520
2	0,255	0,260

Lösung B Anzahl der ccm	Gefunden Indikan in mg	Berechnet Indikan in mg
8	0,548	0,520
6	0,382	0,390
4	0,265	0,260
2	0,128	0,130

In konzentrierten Lösungen sind die Differenzen etwas größer als in verdünnten Lösungen; es ist aber kein Zweifel, daß bei Verwendung geeigneterer Apparate die Einstellung der Farbennuancen wesentlich schärfer erfolgen könnte.

Jedenfalls geht aus den Versuchen hervor, daß in reinen Indikanlösungen der Indikangehalt nach dem beschriebenen Verfahren kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Über die quantitative Bestimmung des Indikans in Harnen.

Ich habe die relativ einfache und theoretisch gut begründete kolorimetrische Methode bei einer Reihe von Harnen

praktisch durchgeführt und hierbei folgenden Vorgang eingehalten:

Der Harn wird mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens an Bleiessig gefällt und das Filtrat zur Bestimmung verwendet. 5–10 ccm Harn (je nach dem Ausfall der qualitativen Vorprobe) werden mit 1 ccm einer 5%igen alkoholischen Thymollösung durch Schütteln im Schütteltrichter gut vermischt und hierauf das gleiche Volumen einer rauchenden Salzsäure, welche 5 g Eisenchlorid pro Liter enthält, hinzugefügt. Nach gründlichem Durchschütteln läßt man ca. 2 Stunden stehen. Dabei scheidet sich das überschüssige Thymol und das gebildete Salz des Indolignons aus. Nach dieser Zeit extrahiert man in der üblichen Weise die Harnflüssigkeit mit reinem Chloroform, bis die letzte Ausschüttelung farblos erscheint. Die einzelnen Ausschüttelungen läßt man in einen anderen Schütteltrichter ab, in dem sich destilliertes Wasser befindet und schüttelt nun den Chloroformextrakt mit diesem gut durch. Hierbei verschwindet die violette Farbe der Chloroformlösung und letztere nimmt einen rotbraunen Farbenton an.

Zum Zwecke der weiteren Reinigung läßt man die Chloroformlösung in den ersten Schütteltrichter abfließen, der inzwischen gereinigt und mit einer sehr verdünnten Natronlauge ($\frac{1}{500}$ bis $\frac{1}{1000}$) beschickt wurde.

Das zurückbleibende Waschwasser, welches einzelne Chloroformtröpfchen zurückhält, wird mit einigen Kubikzentimeter reinem Chloroform geschüttelt und auch dieses in den Schütteltrichter mit der Alkalilösung gebracht. Nach mehrfachem Umschütteln läßt man den Inhalt des Schütteltrichters einige Zeit ruhig stehen, bis sich die Chloroformschicht gut abgesetzt hat; hierauf wird die Chloroformlösung in ein 25 oder 50 ccm fassendes Kölbchen abfließen gelassen. Man füllt dann bis zur Marke mit reinem Chloroform auf, schüttelt um und läßt die so erhaltene Chloroformlösung noch einige Zeit ruhig stehen, wobei eventuell mitgerissene Wassertröpfchen sich an den Glaswandungen absetzen.

Für die kolorimetrische Bestimmung bereitet man sich eine Standardlösung aus synthetisch gewonnenem 4 Cymol-2-

indolindolignon, von dem man 0,01 g in 100 ccm Chloroform auflöst. Diese Standardlösung ist gut haltbar. Für die jeweiligen kolorimetrischen Bestimmungen werden 5 ccm der Standardlösung auf 50 ccm mit Chloroform verdünnt und mit der so erhaltenen Lösung die Choroformausschüttelung aus dem Harne im Kolorimeter in der bereits beschriebenen Weise verglichen.

Nach diesem Verfahren habe ich den Indikangehalt einer Anzahl verdünnter und konzentrierter Harne, von normaler sowohl als auch von pathologischer Beschaffenheit durchgeführt.

In den meisten Fällen konnte die kolorimetrische Bestimmung gut durchgeführt werden. Bei einigen Harnproben zeigte die Chloroformlösung einen Farbenton, der mit dem der Vergleichslösung nicht ganz übereinstimmte. Es gelang aber dann durch Neuausschüttelung einer frischen Harnportion verwendbare Lösungen zu erhalten. Nur in zwei Fällen war die kolorimetrische Bestimmung trotz mehrfacher Wiederholungen nicht durchführbar und die nähere Prüfung ergab, daß beide Harnproben von Patienten stammten, die verschiedene Medikamente eingenommen haben. Da es zu weit führen würde, durch systematische Versuche festzustellen, welche Medikamente auf die Durchführung der kolorimetrischen Methode störend einwirken können, habe ich sämtliche in der nachstehenden Tabelle verzeichneten quantitativen Indikanbestimmungen ausschließlich in Harnen durchgeführt, bei welchen der Einfluß einer Medikation als ausgeschlossen erachtet werden kann. Bezüglich der Arbeitsbedingungen ist zu bemerken; daß man sowohl bei der Herstellung der Standardlösung, als auch bei den sonstigen Manipulationen auf unbedingte Reinheit der verwendeten Gefäße und Pipetten achten muß, weil schon sehr geringe Spuren von Säuren eine Veränderung des Farbentones hervorrufen können.

Auch sei darauf hingewiesen, daß die beschriebene Methode ein sehr exaktes Arbeiten voraussetzt, zumal bei kolorimetrischen Bestimmungen naturgemäß schon geringe Fehler das Gesamtergebn wesentlich beeinflussen. Aus diesem Grunde wird das Verfahren auch kaum ein Gemeingut des praktischen Arztes werden können.

Neben der Indikan-Bestimmung nach dem neuen kolorimetrischen Verfahren wurde zum Vergleiche in jedem Harne der Indikangehalt nach den titrimetrischen Methoden von Ellinger¹⁾ (modifizierte Wang-Obermayersche Methode) und Imbabuchi²⁾ ermittelt.

In einzelnen Fällen wurde der Indikangehalt auch nach der Boumaschen Methode³⁾ festgestellt.

Die titrimetrischen Methoden zur Bestimmung des Harnindikans mit Permanganat haben eine möglichst weitgehende Reindarstellung des durch Oxydation erhaltenen indigoiden Farbstoffes zur Grundlage.

Der Farbstoff muß frei von organischen Beimengungen sein, mögen diese nun aus dem Harn herrühren oder bei der Reaktion erst entstanden sein. E. Wang,⁴⁾ dem wir die erste brauchbare Methode zur Indikanbestimmung im Harne verdanken, hat die Verbesserung seines Verfahrens eine Reinigung des Chloroformrückstandes mit Äther-Alkohol-Wasser (1 : 1 : 1) vorgeschlagen. Maillard⁵⁾ empfahl, die Farbstofflösung in Chloroform mit schwachem Alkali zu schütteln und nachher vom Alkali durch Waschen mit Wasser zu befreien. Am einfachsten verfährt Ellinger, indem er sich mit einer mehrmaligen Waschung mit heissem Wasser begnügt. Bei dieser Arbeitsweise soll nach Imbabuchi eine Ablösung des Indigos von der Gefäßwand nicht vorkommen, eine Behauptung, die nach meinen Erfahrungen nicht immer zutrifft.

In vielen Fällen ist ein Verlust nicht zu vermeiden. Denn gerade bei der geringen Menge des Indigo, die man öfters hat, ist eine Beobachtung abgelöster Teilchen häufig nicht möglich. Dies gilt insbesondere für starken Rückstand liefernde Harne, bei denen es oft vorkommt, daß sich braune, in Wasser nicht lösliche Schmierungen bilden, die mit heißem Wasser in Berührung

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 38, S. 178, 1903.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 60, S. 502, 1909.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 32, S. 82, 1901 und Bd. 39, S. 356, 1903.

⁴⁾ Diese Zeitschr., Bd. 25, S. 406, 1898.

⁵⁾ Maillard, *L'indoxyle urinaire etc.*, Paris 1903 und diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 437, 1904.

gebracht, flüssig werden und auf dem Wasser schwimmen. Dieselben können ganz wohl Indigoteilchen enthalten, die so der Bestimmung entgehen.

Nach meinen Erfahrungen könnte bei dem Verfahren nach Ellinger auch darin eine Fehlerquelle liegen, daß die Abspaltung des Indoxyls mit Salzsäure in der Kälte aus dem Indikan nicht immer momentan quantitativ erfolgt. Vielleicht ist unter anderem auch auf diesen Umstand das häufige Plus an Indikan nach der Methode von Imbabuchi zurückzuführen. Wird doch bei dieser Methode vor dem Ausschütteln ca. zehn Minuten stehen gelassen, während von Ellinger die sofortige Extraktion mit Chloroform vorgeschrieben ist.

Die Ausschüttelungen mit Chloroform nach Ellinger waren in der Regel schön blau. Erst beim Eindampfen trat der auch von anderen Forschern beobachtete Umschlag in rot-violett ein. Durch einen einfachen Versuch läßt sich die Ursache dieser Umfärbung feststellen. Löst man gleiche Mengen reinen Indigos (Handelsprodukt) einmal in reinem Chloroform, das andere Mal in solchem Chloroform auf, das durch Schütteln mit konzentrierter Salzsäure mit Salzsäuregas gesättigt ist, so erhält man fast gleichtönige Lösungen. Sobald man aber die beiden Lösungen erhitzt, tritt ein Unterschied auf. Die salzsäurehaltige Lösung wird rasch tief violett, während die andere schön blau bleibt. Es ist damit festgestellt, daß dieser interessante Farbumschlag nur auf der Sättigung des Chloroforms mit Salzsäuregas beruht, die beim Schütteln mit dem stark salzsauren Harn eintreten muß.

Ellinger hat die Fehlergrenze der quantitativen Indikanbestimmung durch Titration des in die Sulfosäure übergeführten Farbstoffes mit Permanganat zu etwa 14—15% festgestellt und zwar in reinen Indikanlösungen. Wie die Verhältnisse aber bei Harnen liegen, ist durch die von Ellinger angestellten Versuche an mit Harn verdünnten reinen Indikanlösungen nicht klargestellt. Denn einerseits sind nur drei Versuche mit reinen Indikanlösungen vorgenommen worden, anderseits zeigte der zum Verdünnen verwendete Harn ein so niedriges spezifisches Gewicht, daß man die so erzielten Resultate nicht gut auf

Harne im allgemeinen übertragen kann. Auch ist insofern eine kleine Differenz in dem angewandten Verfahren gegenüber der üblichen Vorschrift zu konstatieren, als Ellinger nur zweimal mit heißem Wasser wäscht, während für den Harn eine 3 bis 4malige Waschung als unbedingt erforderlich bezeichnet wird. Es ist auch nicht erwähnt, ob die Reduktionsfähigkeit der Waschwässer geprüft wurde und ob tatsächlich schon das zweite Waschwasser frei von reduzierenden Substanzen war. Weiter sei auf die Ausführungen von Bouma¹⁾ hingewiesen, daß man bei Wiederholung der Ausschüttelung nach einiger Zeit noch immer Indigo erhalten kann.

Aus diesen Darlegungen geht hervor, daß man den von Ellinger festgesetzten Verlust von ca. 14—15% nicht als Durchschnittszahl auffassen kann, vielmehr dürften bei pathologischen und konzentrierten Harnen die Fehler wesentlich höhere sein.

Bezüglich der Methode von Imbabuchi, welche sich bekanntlich von der Ellingerschen durch die Anwendung eines anderen Oxydationsmittels, nämlich des Kupfervitriols in salzsaurer Lösung, unterscheidet, gelten dieselben Bedenken, wie für die Ellingersche Methode. Die im allgemeinen etwas höheren Resultate nach Imbabuchi dürften, wie schon Ellinger hervorgehoben hat, auch darauf zurückzuführen sein, daß eine weitere Oxydation des Indigos zu Isatin nicht so leicht erfolgt, wie bei Verwendung von Eisenchlorid.

Während die oben erwähnten Methoden das Indoxyl des Harns in Indigo überführen, beruht bekanntlich die Methode von Bouma²⁾ und auch die von Authenrieth und Funk modifizierte Boumasche Methode darauf, daß das Indoxyl im Harn mit Isatin zu Indigrot (Indirubin) gekuppelt wird. Bei der Nachprüfung der Boumaschen Methode konnten die guten Resultate Boumas nicht bestätigt werden. Während man bei Harnen mit höherem Indikangehalt schön rote Lösungen erhält (blaue Töne fanden wir nur selten), war es nicht möglich, bei Harnen mit niedrigem Indikangehalt überhaupt eine Indig-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 39, S. 356, 1903.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 39, S. 356, 1903.

rotbildung festzustellen. In der Kälte (beim Versetzen mit der Isatinsalzsäure) erhielt ich zwar eine Rotfärbung des Harnes resp. der Ausschüttelung. Nach dem vorgeschriebenen Erwärmen auf dem kochenden Wasserbade aber färbte sich die Flüssigkeit nur tief dunkelbraun und mit Chloroform ließ sich bloß ein schmutzig rotbrauner Extrakt gewinnen, der durch Auskochen mit Wasser nur sehr schwer gereinigt werden konnte.

Die weiter gewonnenen Sulfosäurelösungen waren weder rot noch klar, sondern schmutzig braunrot und ließen einen Endpunkt der Titration absolut nicht erkennen.¹⁾

Ganz ähnliche Erfahrungen hat auch Ellinger gemacht.²⁾

Für klinische Zwecke hat Bouma seine Methode kolorimetrisch verwertet, indem er die Chloroformextrakte in seinem Indikanurometer mit Standardlösungen von Indigrot verglich. Ich habe ebenfalls versucht, den Indikangehalt einiger Harnes kolorimetrisch nach dem Boumaschen Verfahren zu bestimmen, aber stets viel zu hohe Werte erhalten, was u. a. auch auf folgende Beobachtung gelegentlich der Anwendung der titrimetrischen Methode von Bouma zurückzuführen sein dürfte. Bei der Waschung des Chloroformrückstandes mit heißem Wasser zeigten die ersten Waschwässer in den meisten der von mir untersuchten Harnproben eine hellrote Färbung. Da diese nicht vom Indirubin herrühren kann, da doch Indirubin in Wasser unlöslich ist, so kann man nur an die Gegenwart anderer roter Farbstoffe denken, die bei der Operation in Harnen in mannigfachen Fällen auftreten. Da nun bei der kolorimetrischen Bestimmung des Indirubins diese Stoffe nicht entfernt werden, müssen die Resultate in solchen Harnen zu hoch ausfallen, was auch tatsächlich der Fall ist.

Autenrieth und Funk³⁾ haben die gleiche Reaktion wie Bouma zu einer klinischen Methode verwendet. Sie führen diese folgendermaßen aus:

¹⁾ Reines Indirubin synthet. krystallisiert zur Einstellung der Permanganatlösung hat mir die Badische Anilin- und Sodafabrik freundlichst überlassen, wofür ich auch an dieser Stelle wärmstens danke.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 38, S. 195, 1903.

³⁾ Münchner mediz. Wochenschrift 1912, Nr. 13 und 14.

«5,5 ccm des Filtrats von der Bleiessigfällung des Harns werden mit 10 ccm der Boumaschen Isatinsalzsäure in einem 100 ccm Erlenmayer-Kölbchen versetzt und nach einer Viertelstunde 10 ccm Chloroform zugegeben. Unter häufigem Umschütteln bleibt das Ganze 4—5 Stunden an einem vor Licht geschützten Ort stehen. Nach dieser Zeit ist alles Indigorot ins Chloroform übergegangen. Man gibt dann in einem Scheidetrichter, läßt die Chloroformschichte in einen graduierten Meßzylinder ab und gibt noch so viel Chloroform durch den Scheidetrichter nach, bis das Volumen genau 10 ccm beträgt.» Hierauf wird die so bereitete Indigorotlösung kolorimetrisch mit einem Standardkeil verglichen und dadurch die Bestimmung vorgenommen. — Die Wertlosigkeit der Methode zeigt sich schon darin, daß man stets nach 4—5 stündigem Stehen aus der Harnlösung noch Indigorot gewinnen kann. Es ist also die Behauptung von Autenrieth und Funk völlig unrichtig, daß dann alles Indigorot in Chloroform gelöst ist. Selbst nach 24 stündigem Stehen war es nicht möglich, mit einer Ausschüttelung das Auslaugen zu finden. Im Gegenteil zeigte es sich, daß bei einem solchen Verfahren eine größere Anzahl von Ausschüttelungen vorgenommen werden muß, um so weit zu kommen, daß das Chloroform nur mehr schwach gefärbt erscheint. Ich habe daher diese Modifikation der Boumaschen Methode überhaupt nicht zum Vergleiche herangezogen.

Ich lasse nunmehr die bei normalen und pathologischen Harnen erhaltenen Indikanwerte tabellarisch folgen.

Ich bemerke, daß bei jedem Harn die Indikanbestimmungen nach den verschiedenen Methoden zu gleicher Zeit vorgenommen wurden, da ich die von Stanford¹⁾ gemachten Angaben über die Unbeständigkeit der indigobildenden Substanzen im Harn beim Stehenlassen bestätigt fand.

Aus den in umstehender Tabelle verzeichneten Resultaten geht zunächst hervor, daß bei einigen Harnen die Methoden von Ellinger und Imbabuchi fast übereinstimmende Zahlen lieferten, bei einigen Harnen waren die Ergebnisse nach Imbabuchi etwas geringer als nach Ellinger, in den meisten

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 87, S. 188—206.

Lau- fende Num- mer	Spez. Ge- wicht g	Pathologische Bestandteile	Indikangehalt in mg pro Liter nach der Methode von:				Differenz in % zwischen Ellinger und Jolles	Differenz in % zwischen Immabuchi und Jolles	Bemerkungen
			Ellinger	Immabuchi	Bouma- titri- metrisch	Bouma- kolori- metrisch			
1	1009	keine	8,4	8,1	nicht titrierbar	—	13,1	17,3	Die Differenz zwischen Ellinger und Immabuchi betrug + 38,8 %.
2	1012	"	10,2	10,9	nicht titrierbar	—	16,7	9,2	
3	1016	"	12,1	16,8	21,6	39,4	44,6	4,2	
4	1014	"	13,2	16,2	nicht titrierbar	—	37,9	12,3	Die Differenz zwischen Ellinger und Immabuchi betrug + 22,7 %.
5	1015	"	12,1	13,0	—	—	18,2	11,0	
6	1019	"	13,4	15,2	nicht titrierbar	—	22,4	7,9	
7	1020	"	16,5	17,2	—	—	20,0	15,1	Die Differenz zwischen Ellinger und Immabuchi betrug — 13,7 %.
8	1022	"	18,6	19,4	—	—	12,9	8,2	
9	1022	positive Diazoreaktion Spur. Albumin	19,1	16,8	33,2	41,6	38,2	57,1	
10	1026	Urobilinogen u. Gallenfarbstoff	22,0	26,4	—	45,3	28,2	6,8	

(Fortsetzung.)

Lauf- Num- mer	Spez. Ge- wicht g	Pathologische Bestandteile	Indikangehalt in mg pro Liter nach der Methode von:				Differenz in % zwischen Ellinger und Jolles	Differenz in % zwischen Immabuchi und Jolles	Bemerkungen
			Ellinger	Imma- buchi	Bouma titri- metrisch	Bouma kolori- metrisch	Jolles		
11	1029	mäßige Mengen Albumin, renale Elemente und 2,8% Zucker	23,8	23,6	—	61,2	37,5	59,3	
12	1030	3,3 % Zucker Aceton, Acet- essigsäure	25,8	25,3	37,2	—	26,9	6,3	
13	1032	Fieberharn	26,4	28,7	42,6	69,2	36,4	26,8	
14	1037	Fieberharn	30,6	31,2	—	—	42,9	37,5	
15	1039	Fieberharn, deutl. Spuren Albumin	38,3	40,4	—	—	49,2	21,8	Nach Angabe des Arztes: Scarlatina.
16	1024	viel Albumin, Blutbestandteil und zahlreiche renale Elemente	45,9	61,3	—	—	70,1	14,3	Die Differenz zwischen Ellinger und Immabuchi betrug + 33,6 %
17	1027	Albumin in mäßigen Mengen einzelne renale Elemente	57,4	62,2	—	—	64,4	10,0	
18	1029	viel Albumin zahlr. renale Elemente	97,6	102,4	182,0	—	131,8	28,7	Nach Angabe des Arztes: Urämische Erscheinungen.
19	nicht be- stimmt	—	258,0	268,0	—	—	277	7,4	Pferdeharn, wurde für d. Bestimmungen 10fach verdünnt.
20	nicht be- stimmt	—	239,0	268,0	—	—	329	22,8	Pferdeharn, wurde für d. Bestimmungen 10fach verdünnt.

Fällen aber sind die Resultate nach Imbabuchi höher ausgefallen. Bei dem Harn Nr. 3 betrug die Differenz sogar $+38,8\%$, bei Nr. 4 $+22,7\%$ und bei Nr. 16 $+33,5\%$.

Die titrimetrische Methode nach Bouma habe ich bei 9 Harnen angewendet. Bei 4 Harnen war es nicht möglich, die Titration durchzuführen, bei den übrigen Proben resultierten zu hohe Zahlen.

Noch weit höher waren die nach der kolorimetrischen Methode von Bouma erhaltenen Werte.

Was nun die Ergebnisse nach meiner Methode betrifft, so bewegen sich bei den normalen Harnen Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 die Differenzen gegenüber der Methode von Ellinger zwischen $12,9\%$ und $22,2\%$. Erwägt man, daß Ellinger die Fehlergrenze der quantitativen Indikanbestimmung durch Titration des in die Sulfosäure übergeführten Farbstoffes mit etwa 15% sichergestellt hat, so können die oben angeführten Resultate nach meinem Verfahren als befriedigend bezeichnet werden. Nur bei den zwei normalen Harnen 3 und 4 ergaben sich wesentlich höhere Differenzen, nämlich $+44,6\%$ bzw. $+36,0\%$.

Bei diesen 2 Proben resultierten aber auch zwischen den Methoden von Ellinger und Imbabuchi Differenzen von $+38,8\%$ bzw. $+22,7\%$, so daß die nach Imbabuchi erhaltenen Zahlen gegenüber den Werten nach dem Thymol-Verfahren nur Differenzen von $+4,0\%$ bzw. $+11,1\%$ zeigen. Versuche, diese Unstimmigkeiten durch Arbeiten unter Luftabschluß nach dem Vorschlage von Stanford¹⁾ (Durchleiten von Kohlendioxyd) zu beseitigen, haben zu keinem positiven Ergebnisse geführt.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache können die bei den untersuchten normalen Harnen nach meinem Verfahren erzielten Werte als die wahrscheinlichsten angesehen werden.

Weit höher sind aber die Differenzen bei den pathologischen Harnen. So finden wir bei dem Harn Nr. 9 eine Differenz zwischen den Werten nach Ellinger und denen der

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 88, S. 47—55.

Thymol-Methode von 38,2%, zwischen den Werten nach Immbuchi und denen der Thymol-Methode von 57,1%, bei dem Harn Nr. 11 Differenzen von 57,9% bzw. 59,3%, bei dem Fieberharn Nr. 14 Differenzen von 40,2% bzw. 37,5% usw.

Aus den Zahlen der Tabelle geht jedenfalls mit Sicherheit hervor, daß die Frage der quantitativen Indikan-Bestimmung im Harn keineswegs als abgeschlossen erachtet werden kann.

Die Versuche an pathologischen Harnen werden fortgesetzt, und ich behalte mir vor, auf eine eingehende kritische Besprechung aller quantitativen Indikan-Methoden zurückzukommen, sobald ich über ein genügend umfangreiches Material, bei welchem auch der Zusatz reiner Indikanlösungen von bekanntem Gehalte erfolgen soll, verfügen werde.

Zusammenfassung.

1. Wenn Harn, der Indikan enthält, mit Thymol und eisenchloridhaltiger konzentrierter Salzsäure versetzt und dann mit Chloroform geschüttelt wird, so nimmt das Chloroform eine schöne violette Färbung an. Diese Reaktion ist auf die Bildung des salzsauren Salzes einer Verbindung von cörolignonartiger Konstitution zurückzuführen und zwar des 4-Cymol-2-indolindolignons.

Diese Substanz entsteht aus 1 Molekül Indoxyl und 1 Molekül Thymol infolge Oxydation durch die eisenchloridhaltige Salzsäure und krystallisiert in schönen roten Krystallen, welche bei 218—220° C. unter Zersetzung schmelzen.

Das Chlorhydrat, welches 1 Mol. HCl enthält, löst sich in Chloroform mit sehr intensiver violetter, das Indolignon selbst dagegen, welches schon auf Zusatz von Wasser oder sehr verdünntem Alkali zu der Chloroformlösung entsteht, mit roter Farbe.

2. Zum qualitativen Nachweis von Indikan im Harn empfiehlt sich diese Reaktion, welche alle bisher vorgeschlagenen Methoden an Empfindlichkeit weit übertrifft, in folgender Ausführung: Man versetzt 10 ccm Harn mit 1 ccm einer 5%igen

alkoholischen Thymollösung und schüttelt um. Hierauf fügt man etwa 10 ccm einer rauchenden Salzsäure hinzu, welche 5 g Eisenchlorid pro Liter enthält, schüttelt nochmals sorgfältig um und läßt ca. 15 Minuten stehen. Nachher fügt man ungefähr 4 ccm Chloroform hinzu und extrahiert durch wiederholtes sanftes Schütteln den Farbstoff, wobei sich das Chloroform intensiv violett färbt. Die Probe gestattet in 10 ccm Harn noch 0,0032 mg Indikan nachzuweisen.

3. Es wird an einer Reihe von Versuchen gezeigt, daß das 4-Cymol-2-indolindolignon sich gut zur quantitativen Bestimmung des Indikans in reinen Lösungen auf kolorimetrischem Wege verwenden läßt.

4. In Harnen erfolgt die quantitative Indikan-Bestimmung wie folgt: 5—10 ccm des mit $\frac{1}{10}$ seines Volumens an Bleiessig versetzten Harns werden mit den entsprechenden Mengen alkoholischer Thymollösung und eisenchloridhaltiger rauchender Salzsäure versetzt, gut gemischt und 2 Stunden stehen gelassen. Hierauf extrahiert man in der üblichen Weise die Harnflüssigkeit mit Chloroform, bis die letzte Ausschüttelung farblos erscheint. Durch Schütteln mit destilliertem Wasser wird der Chloroform-Ausschüttelung die Salzsäure entzogen. Die Chloroformlösung wird dann mit Chloroform auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und der Gehalt an Indolignon kolorimetrisch bestimmt.

Als Standardlösungen verwendet man eine Lösung von 0,01 g 4-Cymol-2-indolindolignon in 100 ccm Chloroform, welche gut haltbar ist und zu einzelnen kolorimetrischen Bestimmungen entsprechend verdünnt wird.

5. In einer Anzahl normaler und pathologischer Harne wurde der Indikangehalt nach der neuen Methode und zum Vergleiche auch nach den Methoden von Ellinger (modifizierte Wang-Obermayersche Methode), Imbabuchi und Bouma bestimmt. In normalen Harnen betrug die Differenz zwischen der Methode von Ellinger und von Jolles im Durchschnitt ca. 23%, zwischen der Methode von Imbabuchi und von Jolles im Durchschnitt ca. 11%. Erwägt man, daß Ellinger die Fehlergrenze der quantitativen Indikanbestimmung durch

Titration des in die Sulfosäure übergeführten Indigofarbstoffes mit etwa 15% sichergestellt hat, so können die nach dem neuen Verfahren erhaltenen Resultate als befriedigend bezeichnet werden.

Weit höher waren aber die Differenzen bei pathologischen Harnen, namentlich bei Fieberharnen und nephritischen Harnen.

6. Die nach der Boumaschen Methode ermittelten Werte haben nach keiner Richtung hin befriedigt.

7. Die kolorimetrische Indikanbestimmung im Harn nach Authenrieth und Funk kann nicht als quantitative Methode bezeichnet werden.

