

Über die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bestimmung des Harnindoxyls.

(Eine Entgegnung gegen Hrn. A. Ellinger und Hrn. J. Bouma).

Von

Louis C. Maillard,

Chef des travaux du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine de Paris.

(Eingegangen am 9. April 1904.)

In einer jüngst publizierten Arbeit hat Herr A. Ellinger¹⁾ bezüglich der Entstehungsart der Indoxylfarben aus den Indoxylchromogenen des Harns, sowie der Methode der Indoxylbestimmung eine Reihe von Widersprüchen zwischen seinen eigenen Resultaten,²⁾ denen von J. Bouma³⁾ und den meinigen⁴⁾ hervorgehoben, sodaß ich mich veranlaßt sehe, die einzelnen strittigen Punkte einer Prüfung zu unterziehen, in derselben Weise, wie dies Herr Ellinger in seiner letzten Abhandlung getan hat.

Ich werde also die folgenden Fragen durchgehen:

1. Über das Vorkommen von Isatin im Harn, der mit Obermayers Reagens versetzt ist.

2. Über die Größe des Verlustes durch Überoxydation in verdünnten Lösungen von indoxylschwefelsaurem Kalium bei der Behandlung mit Obermayers Reagens.

3. Über die Notwendigkeit, die Chloroformlösung der erhaltenen Farben mit alkalischer Waschung zu reinigen.

¹⁾ A. Ellinger, Einige strittige Punkte bei der quantitativen Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 20.

²⁾ A. Ellinger, Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

³⁾ J. Bouma, Nachtrag zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 356.

⁴⁾ L. C. Maillard, L'Indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent, 1 vol. in 8°, 120 p., Paris, Schleicher frères, 1903.

Die weitere Frage ist die wichtigste in der ganzen Diskussion, denn sie betrifft meines Erachtens denjenigen Punkt, um den sich die ganze Indoxylfrage dreht, sowohl vom Standpunkte des reinen Chemikers, wie auch des Praktikers. Denn es handelt sich um die Beurteilung der Vereinfachung, die meine Untersuchungen auf dem Gebiete der physiologischen und pathologischen Harnfarbstoffe gebracht haben, und ferner der diagnostischen Aufschlüsse, die man bei der Prüfung eines normalen oder pathologischen Urines über seine Zusammensetzung wird gewinnen können.

Die Frage ist folgende: Ist der blaue Farbstoff, der in das Chloroform übergeht, wenn man es mit angesäuertem Urin schüttelt, Indigotin oder nicht? Meiner Ansicht nach ist derselbe dem Indigotin sehr nahe verwandt, aber doch davon zu unterscheiden und zwar gründet sich dies auf zwei Eigenschaften: Erstens, nebensächlicheres, seine größere Löslichkeit in Chloroform, dann das wichtigste, nämlich die Fähigkeit, sich in Indirubin verwandeln zu können. Ich werde also weiter nacheinander die folgenden Punkte prüfen:

4. Chlorformlöslichkeit der aus dem Urin ausgeschüttelten blauen Substanz.

5. Überführung derselben in Indirubin.

Schließlich werde ich noch einige Worte darüber zu sagen haben, wie die Überführung des blauen Farbstoffes in den roten entdeckt wurde, und habe mich mit meinen Bemerkungen sowohl an Herrn J. Bouma, wie an Herrn A. Ellinger zu wenden, also:

6. Ursprung der Entdeckung, daß der durch Chloroformausschütteln gewonnene blaue Farbstoff in Indirubin übergeführt werden kann.

I. Das Vorkommen von Isatin in Urin, der mit Obermayers Reagens behandelt wurde.

Diese Frage scheint mir keiner eingehenden Diskussion mehr zu bedürfen, seitdem Ellinger¹⁾ und ich²⁾ gleichzeitig

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 186.

²⁾ L. C. Maillard, *L'Indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent*, p. 69, Paris 1903.

das Isatin in Urin fanden, der mit Obermayers Reagens behandelt war, und seitdem Bouma¹⁾ wenigstens für gewisse Fälle diesen Befund bestätigt hat.

II. Die Größe des Verlustes durch Überoxydation in verdünnten Lösungen von indoxylschwefelsaurem Kalium.

Nachdem ich durch meine früheren Untersuchungen festgestellt hatte, daß ein Teil des Harnindoxyls durch das Obermayersche Reagens in Isatin verwandelt wird und dann durch die darauffolgenden Manipulationen der quantitativen Bestimmung entzogen wird, stellte ich mir die Frage, ein wie großer Bruchteil des Indoxyls auf diese Weise zu Isatin überoxydiert werden kann, besonders in dem Falle, wenn die Flüssigkeit keine oxydablen Substanzen enthielt, die imstande sind, das Indoxyl zu schützen. An einer andern Stelle²⁾ habe ich mitgeteilt, daß eine Auflösung von 0,01—0,02 g indoxylschwefelsaurem Kali im Liter Wasser, wenn man sie mit dem gleichen Volumen des Obermayerschen Reagens versetzt und dann mit Chloroform schüttelt, keine Spur einer Verfärbung mehr hervorrief.

Dahingegen hat Ellinger³⁾ unter sonst gleichen Bedingungen noch mit einer Verdünnung von 2 oder sogar 1 mg indoxylschwefelsaurem Kalium eine deutliche Blaufärbung des Chloroforms erzielen können. Ein solcher Widerspruch zwischen unsern beiden Resultaten scheint mir sehr in die Augen zu fallen. Ellinger sucht dies damit zu erklären, daß er behauptet, mein Präparat sei nicht rein gewesen. Möglicherweise ist ja nun in dem strittigen Punkte die Meinung Ellingers die richtige, aber gewiß aus einem ganz andern Grunde, als wegen der von Ellinger angenommenen Unreinheit meines Präparates. Natürlich konnte ich bei der geringen Menge von Indoxylsulfat, über die ich überhaupt nur verfügte, nicht noch einen ausreichenden Teil für eine genaue Kontrolluntersuchung opfern, wie ich es gerne getan hätte, aber ich habe trotzdem gute Gründe,⁴⁾ mein Präparat als rein zu betrachten, und die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 366.

²⁾ L'Indoxyle urinaire etc., p. 31.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 26.

⁴⁾ L'Indoxyle urinaire etc., p. 30.

Spuren fremder Substanzen, die es hat enthalten können, werden, wie ich glaube, nicht hingereicht haben, um die Obermayersche Reaktion zu stören.

Die wahre Ursache für die erwähnte Verschiedenheit ist in dem Obermayerschen Reagens selbst zu suchen. Nach Veröffentlichung dieser Versuche nämlich machte ich die Beobachtung, daß die Flaschen mit dem Reagens, das durch Auflösung von 2,5 g kristallisiertem FeCl_3 in 1 Liter konzentrierter Salzsäure gewonnen war, wenn man sie einige Tage dem Lichte aussetzte, einen intensiven Geruch nach Chlor oder Oxyden des Chlors verbreiteten. Ohne für jetzt dieser Erscheinung näher nachforschen zu wollen, muß ich es doch als möglich hinstellen, daß das in Lösung befindliche Eisen, vielleicht als Katalysator wirkend, die Oxydation der Salzsäure beschleunigt habe. Wie dem auch sei, jedenfalls hatten diese Flüssigkeiten eine ganz außergewöhnlich große Oxydationskraft. Möglicherweise habe ich nun bei meinen Versuchen mit verdünnten Lösungen von Indoxylsulfat ohne mein Wissen ein auf diese Weise verändertes Reagens verwendet, was die Hyperoxydation des Indoxyls zu Isatin erklären würde.

Auf diese Fehlerquelle muß jedenfalls hingewiesen werden und man wird von nun an bei allen derartigen Untersuchungen sich vor einer Veränderung des Obermayerschen Reagens zu hüten haben.

Wenn man aber die Widerstandsfähigkeit des Indoxylsulfates gegenüber einer Salzsäurelösung, die außer FeCl_3 nichts anderes Oxydierendes enthält, in Betracht zieht, so ist doch wohl anzunehmen, daß die Resultate Ellingers der Wahrheit mehr entsprechen als die meinigen, was ich um so lieber zugebe, als ich wünsche, daß in anderen Punkten meine Meinung aufrecht erhalten werde.

III. Über die Notwendigkeit, die Chloroformlösung der erhaltenen Farben mit alkalischer Waschung zu reinigen.

Hier folgt zuerst eine der analytischen Vorschriften, auf deren Befolgung ich aufs neue dringend hinweisen möchte. Nachdem der Urin mit basischem Bleiacetat gereinigt, das Fil-

trat mit Salzsäure (mit oder ohne Zusatz von FeCl_3) behandelt und mit Chloroform erschöpft ist, nachdem man ferner die Chloroformlösung dekantiert und filtriert hat, ist diese doch noch nicht rein, selbst wenn sie völlig klar erscheint. Mehrmaliges Schütteln mit destilliertem Wasser bringt zwar einige bräunliche Produkte und den Überschuß von Salzsäure zum Verschwinden, aber trotzdem bleibt die Chloroformlösung noch sehr unrein.

Bei anderer Gelegenheit¹⁾ habe ich den Nachweis erbracht, daß die Chloroformlösung, nachdem man sie mit reinem Wasser geschüttelt, dekantiert und filtriert hat, mindestens noch die folgenden Substanzen enthält: Indigotin (oder Hemiindigotin), Indirubin, Spuren von Isatin,²⁾ Phenol, aromatische Säuren und Oxy Säuren, und eine oder mehrere gelbe Substanzen; kurz es ist darin, abgesehen von den Indigofarbstoffen neutralen Charakters, eine Menge organischer Produkte saurer Natur vorhanden.

Welche sind nun die Substanzen des Chloroformauszuges, die in die schwefelsaure Lösung übergehen müssen, um der Titration mit KMnO_4 unterworfen zu werden? Offenbar nur die Derivate des Indoxyls und zwar vor allem das Indigotin und das Indirubin. Die Phenole und die aromatischen Säuren und Oxy Säuren haben ja offenbar nichts mit der quantitativen Bestimmung des Indoxyls zu tun. Das Isatin aber ist, wenn die Oxydation nur hinreichend vorsichtig vorgenommen war, noch gar nicht aufgetreten; sollten jedoch trotzdem Spuren davon vorhanden sein, so hat es keinen Wert, sie zu beseitigen, denn bei der Titration mit KMnO_4 sind sie nicht im Wege.

Es bleiben nun noch die übrigen gelben Substanzen, die trotz der Behandlung mit destilliertem Wasser in dem Chloroform zurückgehalten werden; die Natur dieses Körpers ist uns unbekannt. Bouma³⁾ hat zwar behauptet, sie seien Derivate des Indoxyls und identisch mit dem «Indigogelb» von Crinsoz; aber abgesehen davon, daß man noch gar nicht weiß, was

¹⁾ L'Indoxyle etc., p. 28—30.

²⁾ Wenn man FeCl_3 gebraucht hat.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 368.

dieses aus dem pflanzlichen Indigo gewonnene «Indigogelb» eigentlich ist und ob es überhaupt von dem Indoxyl her stammt, hat es auch gar keinen Wert, es mit den gelben Produkten aus dem Urin, um die es sich hier handelt, in Verbindung zu bringen. Die einzigen Merkmale, welche Bouma für diese Identität anführen konnte, sind folgende: Der aus dem Urin gewonnene gelbe Farbstoff ist schwer löslich in kaltem, leicht in warmem Wasser, ferner mit gelber Farbe in Alkalien, mit braungelber in konzentrierter Schwefelsäure löslich. Das ist aber sehr wenig, und man wird gewiß ohne Mühe eine Menge gelber Stoffe finden können, die dieselben Eigenschaften aufweisen, sodaß es sehr gewagt erscheint, auf Grund dieser Voraussetzungen zu behaupten, daß die gelbe Substanz des Chloroformextrakts sich vom Indoxyl ableite.

In einer Reihe von Fällen habe ich untersucht,¹⁾ ob die in Rede stehenden gelben Stoffe Stickstoffe enthalten, habe aber keinen darin gefunden. Ich will damit nicht behaupten, daß die Chloroformlösung niemals Stickstoff (außer in Indigoblau und Indirubin) enthalten könnte, nur daß der Stickstoff kein regelmäßiger Bestandteil der gelben Substanz ist und diese auch nicht der Indoxylgruppe angehören kann.

Ohne mich des näheren über ihre Natur aussprechen zu wollen, möchte ich es doch für wahrscheinlicher halten, daß sie ein phenol- oder chinonartiges Oxydationsprodukt sei, oder daß sie vielleicht zu den Huminstoffen gehöre.

Alles in allem: solange das angebliche «Indigogelb» nicht als solches erwiesen ist, wird man es vor der Bestimmung ausscheiden müssen und die Methode Boumas,²⁾ die sich damit begnügt, den Chloroformrückstand auf dem Wasserbade zwecks Entfernung flüchtiger Verunreinigungen zu erwärmen, von einer Reinigung mit warmem Wasser aber absieht, aus Furcht, den gelben Farbstoff zu entfernen, scheint mir nicht zulässig.

Aus dem eben Gesagten ergibt sich also, daß alle Bestandteile der Chloroformlösung, mit Ausnahme des Indigotins (oder Hemiindigotins) und des Indirubins, als Verunreinigung zu

¹⁾ L'Indoxyle etc., p. 28.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 369.

betrachten sind und vor der Titration beseitigt werden müssen. Die Gesamtheit der Verunreinigungen, in Schwefelsäurelösung gebracht, vermag, wie ich mich überzeugt habe, ein wenig Kaliumpermanganat zu reduzieren.¹⁾ Wenn auch, wie es die Ansicht Ellingers²⁾ ist, diese Fehlerquelle in mehreren Fällen minimal und deshalb nicht sehr beachtenswert erscheine, so kann man darüber doch nie im voraus Sicheres wissen, denn die Menge und Art der chloroformlöslichen sauren Verunreinigungen wechselt möglicherweise sehr mit der Art des jedesmal untersuchten Urines, besonders in pathologischen Fällen.

Außerdem habe ich schon darauf aufmerksam gemacht,³⁾ daß die Anwesenheit von bräunlichen Stoffen in einer Flüssigkeit, in der man bei gelber Grundfarbe das Verschwinden der letzten Spur Rosa beobachten will, die schon an sich schwierige Bestimmung des Endes der Reaktion unmöglich macht. Hierin wird mir Ellinger gewiß nicht widersprechen können, denn er führt, allerdings ohne mich zu zitieren, selbst meine Argumente an.⁴⁾ — Somit halte ich also daran fest, daß es unerläßlich ist, die Indoxylfarben von allen Verunreinigungen zu befreien.

Ist nun die Reinigungsmethode, deren sich Ellinger⁵⁾ bedient, ausreichend? Sie besteht darin, daß man die rohe Chloroformlösung, so wie man sie aus dem Urin gewonnen hat, destilliert und dann den Trockenrückstand mit warmem Wasser wäscht. Ohne Zweifel beseitigt man auf diese Weise eine beträchtliche Menge von Verunreinigungen, aber die trockene Indigokruste hält noch einen Teil davon energisch fest,⁶⁾ und in dieser Meinung kann es mich auch bestärken, wenn Ellinger⁷⁾ selbst niemals deutliche Millonsche Reaktion in seinem Waschwasser hat nachweisen können, vorausgesetzt, die Extraktion

¹⁾ L'Indoxyle etc., p. 81.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 27.

³⁾ L'Indoxyle etc., p. 82.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 28.

⁵⁾ Ellinger, Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

⁶⁾ L'Indoxyle etc., p. 82.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 189.

mit Chloroform war nicht zulange fortgesetzt worden, während ich doch immer Phenole in der Chloroformlösung habe nachweisen können. Außerdem riskiert man stets, beim Waschen des Trockenrückstandes mit warmem Wasser einige Teilchen abzureißen und sich auf diese Weise mancherlei Schwierigkeiten zu bereiten.

Demgegenüber ist das Verfahren, welches ich anwende, gleichzeitig zuverlässig scharf und bequem, indem man dabei nicht Gefahr läuft, Teilchen mitgerissener Substanz wieder sammeln zu müssen.

Es besteht einfach darin,¹⁾ daß man die (schon vorher mit reinem Wasser ausgeschüttelte) Chloroformlösung mit einer Natronlösung von 1 auf 1000 wäscht. Dann gehen sofort alle fremden Substanzen in die alkalische Flüssigkeit über. Alle, die dies Verfahren auf meine Empfehlung angewandt haben, sind sehr damit zufrieden gewesen und haben ausdrücklich hervorgehoben, mit welcher Schärfe die einfache Mischung der Lösungen sofort die gelben Verunreinigungen zu beseitigen vermag. Zweifellos wird Herr Ellinger selbst die Methode prüfen und gewiß wird die Vorliebe für seine eigene Methode in den Hintergrund treten gegenüber dem ihm eigenen Bestreben, mit möglichst korrekten Mitteln zu arbeiten.

Die mit dem alkalischen Wasser gewaschene Chloroformlösung wird dann zur Beseitigung von Spuren Alkali mit reinem Wasser behandelt. Wenn man sie nun eindampft, so bleibt ein Rückstand, den man nur in üblicher Weise mit Schwefelsäure aufzunehmen hat, um die gewünschten Sulfoverbindungen des Indigotins und Indirubins in völliger Reinheit zu erhalten.

IV. Chloroformlöslichkeit der aus dem Urin ausgeschüttelten blauen Substanz.

Meine Meinung ist es auch jetzt noch, daß die blaue Substanz, die durch Schütteln in das Chloroform übergeht, vom Indigotin verschieden ist. An anderer Stelle²⁾ habe ich bereits

¹⁾ C. R. Soc. de Biologie, vol. LV, p. 696; C. R. Académie des Sciences, vol. CXXXVI, p. 1472; L'Indoxyle etc., p. 4, 28, 50, 72, 81, 82.

²⁾ C. R. Acad. d. Sciences, vol. CXXXIV, p. 470; L'Indoxyle etc., p. 18—20.

darauf aufmerksam gemacht, daß, wenn man das passende Verhältnis zwischen dem Urin und dem Lösungsmittel auswählt, man oft Lösungen bekommt, die sich ganz anders als eine gesättigte Lösung von Indigotin in Chloroform verhalten und sich doch nicht im Zustande der übersättigten Lösung befinden, denn sie bilden nach langem Stehen keinen Niederschlag, vielmehr zeigen sie eine Umwandlung, von der weiterhin noch die Rede sein soll.

Ellinger¹⁾ weist auf Versuche hin, aus denen hervorgehen soll, daß der augenfällige Unterschied in der Löslichkeit allein auf die Anwesenheit von Salzsäure im Chloroform hindeute, denn gewöhnliches Indigotin löse sich viel ausgiebiger in salzsäurehaltigem Chloroform, als in neutralem. Das ist sehr gut möglich, und ich möchte noch hinzufügen, daß die Rolle der Säure sich in diesem Falle nicht auf die alleinige Erhöhung der Löslichkeit zu beschränken scheint, denn gewisse Beobachtungen legen den Gedanken nahe, daß die Wirkung einer auch nicht sehr konzentrierten Salzsäurelösung zu Erscheinungen viel komplizierterer Art führen könne, über die ich mich hier gegenwärtig aber nicht zu äußern habe.

Aber selbst zugestanden, man könne sich nicht auf den Unterschied in der Löslichkeit der beiden Substanzen stützen, so hat das durchaus eine minimale Bedeutung für die Frage nach dem Hemiindigotin. Ich glaubte auf die empirisch gefundene Tatsache der größeren Löslichkeit hinweisen zu müssen, habe ihr aber stets nur einen nebensächlichen Wert beigemessen. Die Chemiker haben ja von jeher so viele Abnormitäten gefunden in der Art, wie sich die Körper gegenüber von Lösungsmitteln verhalten, sodaß man sich mit solchen Unterschieden wohl nicht begnügen darf, wenn man die Identität oder Verschiedenheit zweier Körper feststellen will. Ganz anders verhält es sich nun aber mit der folgenden Erscheinung.

V. Überführung der aus dem Urin mit Chloroform extrahierten blauen Substanz in Indirubin.

Im Jahre 1902 habe ich²⁾ behauptet, daß die im Chloroform angehäuften blaue Substanz sich unter gewissen Umständen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 31.

²⁾ C. R. Acad. d. Sciences, vol. CXXXIV, p. 470.

in Indirubin umwandelt. Da eine Reihe Präparate von Indigotin verschiedenster Herkunft (auch aus dem Urin trocken dargestellte wurden verwendet), wenn man sie nur ganz kurze Zeit mit einer sehr verdünnten Alkalilösung in Berührung ließ, niemals ein ähnliches Verhalten zeigte,¹⁾ so zog ich daraus den Schluß, daß die unter dem Namen Indigoblau oder Indigotin gewöhnlich bekannte Substanz sich von der blauen in angesäuertem Chloroform vorhandenen unterscheiden müsse, und bezeichnete die letztere vorläufig mit dem Namen Hemiindigotin.

Ellinger²⁾ meint ich habe mich getäuscht und die beiden Substanzen seien identisch; wenn er das aber beweisen will, so muß er entweder feststellen, daß mein Hemiindigotin sich nicht in Indirubin umwandeln läßt, oder daß das gewöhnliche Indigotin dieser Umwandlung gleichfalls unterzogen werden kann.

Nun aber wandelt sich die blaue Substanz in der sauren Chloroformlösung zu Indirubin um, in der Kälte langsam, in der Wärme jedoch schneller. Bouma³⁾ hat als der erste deutlich auf diese Erscheinung aufmerksam gemacht, ihr Vorhandensein aber aus Rücksicht auf die damals herrschenden Theorien widerrufen und das anfangs Beobachtete in Abrede stellen zu müssen geglaubt.⁴⁾ Als ich nun meinerseits⁵⁾ im Jahre 1902 die Überführung der blauen, im sauren Chloroform gelösten Substanz in Indirubin konstatiert hatte und auf diese Weise die Tatsachen gegenüber den Theorien wieder zu Ehren brachte, kam Herr Bouma sogleich auf seine Meinung zurück und nahm, ohne meine Veröffentlichungen auch nur zu erwähnen, das Urheberrecht für diese Entdeckung für sich in Anspruch.⁶⁾ Dabei haben Porcher und Hervieux⁷⁾

¹⁾ L'Indoxyle etc., p. 22.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 32.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 354.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 122.

⁵⁾ C. R. Acad. d. Sciences, vol. CXXXIV, p. 470; Bull. de la Société chim., Paris, vol. XXIX, p. 536; C. R. Soc. Biologie, vol. LV, p. 777.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 364.

⁷⁾ Ch. Porcher und Ch. Hervieux, Über Harnindikan, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 147.

die Genauigkeit meiner Angaben bestätigt und sogar Ellinger¹⁾ hegt keinen Zweifel an der erwähnten Umwandlung, vielmehr gibt er in seiner letzten Abhandlung zu, daß der Übergang von Blau in Rot eine Beobachtung ist, «welche wohl noch niemandem bei Ausführung einer Indikanbestimmung nach der alten Wangschen Methode entgangen ist».²⁾ Da also auch Ellinger dies zugibt, so ist man sich darin ja nun einig, daß die von mir als Hemi-indigotin bezeichnete Substanz sich in Indirubin umwandeln kann.

Verhält sich nun das Indigotin ebenso? Wang,³⁾ welcher sowohl gereinigtes pflanzliches Indigotin, als auch aus Urin in festem Zustande gewonnenes stundenlang mit Chloroform unter Anwendung des Rückflußkühlers kochen ließ, hat keinen Wechsel in der Probe beobachten können. Bouma⁴⁾ kam zu demselben Resultat und dieser Mißerfolg veranlaßte ihn, den Gedanken an die Umwandlung des blauen Farbstoffes in den roten, die er früher bei der Untersuchung am Urin beobachtet hatte, aufzugeben. Mich hat nun gerade diese Unmöglichkeit, das Indigotin in Indirubin überzuführen, auf den Gedanken gebracht, daß in dem Chloroformextrakt des Urins noch eine besondere Substanz sein müsse, und die negativen Resultate,⁵⁾ die ich erhielt, erstrecken sich auf Indigotin der verschiedensten Herkunft; so sieht sich denn auch Ellinger,⁶⁾ der «darüber keine eigene Erfahrung» hat, gezwungen zuzugeben, daß alle diese Untersuchungen anscheinend die Unmöglichkeit erweisen, reines Indigotin in Indirubin überzuführen.

Aber, meint er, wenn das Indigotin schon von einer gewissen Menge Indirubin begleitet ist, dann bewirkt möglicherweise das letztere den Beginn der Reaktion und die Umwandlung kann sich alsdann weiter fortsetzen. Ellinger glaubt dies durch folgenden Versuch erwiesen⁷⁾ zu haben: Synthetisch gewonnenes Indigotin B. A. S. F., das ein wenig Indirubin ent-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 187.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 22.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 576.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 122.

5) L'Indoxyle etc., p. 22.

6) Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 32.

7) Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 31.

hält, wird mit Chloroform, das vorher mit Salzsäure behandelt war, geschüttelt. Man erhält eine deutlich violette Lösung, die durch Destillation auf dem Wasserbad in Rotviolett übergeht. Dieser Wechsel der Farbe während des Destillierens wäre nun allerdings ein gewichtiger Einwand, wenn er wirklich den Beweis für die Bildung einer neuen Menge Indirubin enthielte. Doch dem ist nicht so; eine längere Erfahrung berechtigt mich zu der Behauptung, daß die bloß angesehene Farbennüance sehr betrügerlich ist und man keineswegs auf diese Weise über den Gehalt an Indirubin zu urteilen imstande ist. Schon lange weiß man, daß Lösungen von Indigotin nicht rein blau sind, sondern einen Stich ins Purpurfarbene aufweisen, was beim Indirubin nicht vorkommt, aber durchaus dem leuchtendroten Teile des Spektrums entspricht. Nachdem ich mir nun mit ziemlicher Mühe eine Reihe Präparate völlig reinen Indigotins hergestellt hatte (d. h. nach mehrmaligem Durchschütteln mit Äther¹⁾ war keine Spur von Indirubin mehr in der Schüttelflüssigkeit), konnte ich beobachten, daß die Chloroformlösungen der verschiedenen Präparate, in Glasflaschen gefüllt, einen purpurroten Widerschein gaben und daß es nur von der Form des Gefäßes abhing, wenn der Farbenton etwas mehr oder weniger violett war; in gleicher Weise kommen die Art der Beleuchtung und die Konzentration der Lösung in Betracht. Wenn man dann also eine Lösung von größtmöglicher Konzentration mit reinem Indigotin herstellt, so wird die Farbe deutlich violett, verdünnt man dann mit Chloroform, oder prüft man einfach nur eine dünnere Schicht, so nähert sich der Ton dem Blau. Konzentriert man aber eine verdünnte, also blaue Lösung, so wird sie ganz unmerklich violett, und dennoch läßt der daraus erhaltene Trockenrückstand im Ätherextrakt keine Spur von Indirubin zurück.

Vielleicht liegt der Beobachtung Ellingers dieses Phänomen zugrunde. Die Lösung mußte ja, wenn er sie auf dem Wasserbade erhitzte, schließlich etwas mehr ins Rote hinüberspielen, aus dem einfachen Grunde, weil sie kon-

¹⁾ L'Indoxyly etc., p. 52.

zentrierter wurde. Daß aber auch nur eine Spur von Indirubin neugebildet sei, ist in keiner Weise erwiesen und somit verliert der Versuch von Ellinger seine Bedeutung.¹⁾

Um eine Umwandlung des Indigotins in Indirubin sicher zu konstatieren, müßte man von einer Chloroformlösung ausgehen, die beide Stoffe in genau bekanntem Verhältnis enthielte, sie mit angesäuertem Chloroform erhitzen und von neuem prüfen, wieviel von jedem Farbstoff jetzt vorhanden ist. Nun kenne ich aber gegenwärtig nur ein Mittel, dies möglich zu machen: Man muß das Indirubin ausscheiden, indem man den Rückstand der abdestillierten Chloroformlösung mit kaltem Äther auswäscht. Ich habe das sehr oft ausgeführt, dabei aber die Erfahrung gemacht, daß immer noch Indirubin in den kleinen Partikelchen von Indigotin zurückgehalten wird und man deshalb stets für eine Erneuerung der Oberfläche zu sorgen hat. Zu diesem Zwecke brach ich den Kolben mit dem Rückstand entzwei und nahm diesen zusammen mit den Scherben mit siedendem Chloroform in einem ununterbrochen tätigen Apparate auf, was bisweilen Wochen in Anspruch nahm. Hätte hierbei das in der Mischung vorhandene Indirubin die Umwandlung des Indigotins befördern können, so wäre hierzu wirklich hinlänglich Zeit gewesen,²⁾ und ich hätte schließlich nur noch Indirubin finden müssen. Nun aber verschwand die letzte Spur von Indirubin schon nach einer sehr geringen Zahl von Ätherextraktionen (3, 4 oder 5), sodaß es sich nur um eine festbegrenzte Menge zu entfernender Substanz, nicht aber um ein sich immer wieder vermehrendes Quantum handeln konnte. Ohne dem Resultate des Versuches, den ich hier eben kurz skizziert habe, vorgreifen zu wollen, kann ich mich

¹⁾ Man könnte sich fragen, ob dieser trüglische Anschein nicht auch das schon erwähnte Phänomen der Umwandlung von Hemiindigotin in Indirubin erklären könnte. Ich weiß darüber nichts für die Beobachtung Boumas; aber, was mich betrifft, habe ich diese Umwandlung nicht bloß auf einen Farbenwechsel, wohl aber auf die Reindarstellung des Indirubins begründet.

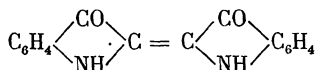
²⁾ Obgleich ich es vermieden habe, dem Chloroform noch selbst Salzsäure zuzusetzen, so fand ich doch, daß sehr bald eine saure Reaktion auftrat, worüber man sich nicht wundern kann.

doch der Ansicht nicht verschließen, daß er wenig Aussichten bietet.

Gegenwärtig ist also kein Grund vorhanden, die Identität der beiden Substanzen aufrecht zu erhalten und an der Eigenartigkeit des (wie ich zugebe, sehr unvöllig bekannten) Körpers, den ich als Hemiindigotin bezeichnet habe, zu zweifeln. Was nun die «Spekulationen» angeht, in die ich mich nach Ellingers¹⁾ Meinung über die in Rede stehende Frage eingelassen habe, so erwidere ich, daß sie in meinen Augen nichts weiter wie jede andere chemische Theorie, nämlich etwas sehr Schematisches und Provisorisches sind. Sollte Herr Ellinger den Wert der Strukturformeln überhaupt in Zweifel ziehen, dann wäre freilich eine Diskussion ohne Aussicht, andernfalls muß er zugeben, daß man verschiedene Körper auch mit verschiedenen Strukturen versehen muß.

Da die Verwandtschaft der beiden blauen Substanzen augenscheinlich war, so lag der Gedanke nahe, sie könnten polymer sein, und man wird verstehen, daß die kryoskopischen Bestimmungen von Vaubel,²⁾ die etwa um dieselbe Zeit veröffentlicht wurden und dem Indigotin wie Indirubin die Formel $C_{32}H_{20}N_4O_4$ zuerteilten, mich nicht veranlassen konnten, meine Meinung zu ändern.

Es ist hier nicht der Ort, alle die Erörterungen noch einmal anzuführen, die in meiner Arbeit über «L'indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent»³⁾ zu finden sind. Nur kurz möchte ich daran erinnern, daß nach meiner Ansicht zwei Moleküle Indoxyl nach Abspaltung des Säurerestes sich direkt zu einem Molekül Hemiindigotin oxydieren:

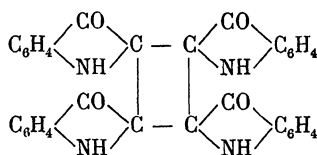


einer blauen Substanz, die sich in alkalischem Mittel beinahe augenblicklich polymerisiert zu Indigotin:

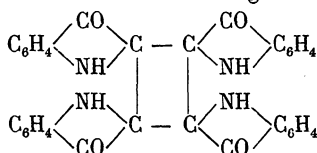
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 32.

²⁾ Chemiker-Zeitung, Bd. XXV, S. 725.

³⁾ L. C. Maillard, L'Indoxyle urinaire et les couleurs qui en dérivent, 1 vol. in 8°, 120 p., Paris, Schleicher frères, 1903.



Kommt dagegen dem Lösungsmittel eine saure Reaktion zu, so polymerisiert sich das Hemiindigotin zu Indirubin:



Was auch immer die Zukunft dieser meiner Ideen sein wird, so muß ich doch darauf hinweisen, daß diese Theorien mir es erlaubten, die Anwesenheit von Indirubin neben Indigotin verständlich zu machen, ferner die Überführung des Indigoblau in Indigorot zu erklären. Des weiteren konnte ich auf diese Weise vorhersehen, wann man bei der Analyse rote, violette oder blaue Chloroformextrakte gewinnt, und schließlich habe ich die Legende vom Skatoxyl aus der Welt geschafft, sodaß sich also jetzt die Erörterungen über eine Reihe von Harnfarbstoffen, die früher Hunderte von Publikationen in Anspruch nahmen, in klarer Weise auf einer einzigen Seite zusammenfassen lassen.

Mögen diese meine «Spekulationen» nur diesen einen Erfolg gehabt haben, mögen sie sich dann später vielleicht überleben, um anderen Platz zu machen (wogegen ich nichts einwenden werde; ohne damit keineswegs sagen zu wollen, daß ich jetzt schon Veranlassung habe, sie zurückzunehmen), so bin ich doch der festen Meinung, daß sie für die Wissenschaft mehr Wert haben, als jenes andere Verfahren, welches zugunsten alter Formeln neugefundene Tatsachen unberücksichtigt läßt.

VI. Über den Ursprung der Entdeckung von der Umwandlung des chloroformlöslichen blauen Farbstoffes in Indirubin.

Möglicherweise ist dieser Vorgang schon vor langer Zeit einmal beobachtet und man mag vielleicht bei den älteren Autoren einige diesbezügliche Andeutungen vorfinden; ich habe

mich indessen wegen Mangels an Zeit nicht danach umsehen können. Der erste, der in ausführlicher Weise über die Überführung von Indigoblau in Indigorot spricht, ist (1891) H. Rosin¹⁾ gewesen. Er unterzog das Indigotin einer Sublimation und fand in dem Sublimat ein wenig Indirubin, aber wie ich an anderer Stelle schon bemerkt habe,²⁾ hat er nicht überzeugend dargetan, daß das ursprüngliche Indigotin frei von Indirubin war, sodaß die Frage noch weiterer Prüfungen bedurfte.

Ferner hat Bouma³⁾ im Jahre 1899 angegeben, daß bei der Destillation einer Chloroformlösung, mit der man Urin behandelt hatte, die blaue Farbe oft in Blauviolett überging.⁴⁾ Als bald darauf Wang⁵⁾ dem entgegenhielt, daß das pflanzliche Indigotin sowie das eingedampfte Urinpräparat einer solchen Farbenänderung nicht unterliegen, untersuchte Bouma⁶⁾ von neuem Indigoblau, aber in festem Zustande, und konnte nun von einer Rotfärbung nichts mehr wahrnehmen. Demzufolge erklärte er unumwunden, er habe sich vorher getäuscht,⁷⁾ und kam erst nach meiner Veröffentlichung auf jene seine frühere Ansicht zurück.

Die Tatsache, daß Bouma später seine erste Beobachtung widerrufen hat, und vollends, daß er dies aus Gründen getan hat, die bis zur Evidenz erwiesen, daß er ihre Tragweite nicht ermessen konnte (denn er hat es ja vorgezogen, die Tatsachen zurückzuweisen, anstatt auf die vorurteilsvolle und gänzlich aus

¹⁾ Arch. für pathol. Anatomie, Bd. CXXIII, S. 560.

²⁾ L'Indoxyle etc., p. 46.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 354.

⁴⁾ «Da ich öfters bemerkt hatte, daß während des Abdestillierens des Chloroforms bei Siedehitze desselben die blaue Farbe plötzlich einen Stich ins Violette zeigte, ja sogar ins Blauviolette umschlug, kam ich zu der schon erwähnten Hypothese der Depolymerisation. —»

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 576.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 122.

⁷⁾ «In meiner vorigen Mitteilung habe ich angegeben, daß schon Erhitzen der Chloroformlösung Indigoblau teilweise in Indigorot umwandeln werde. Ich muß Wang zugeben, daß ich mich in dieser Angabe geirrt habe. Beim Nachprüfen mit reinem aus der Bayerschen Fabrik erhaltenem Indigoblau habe ich diese Angabe nicht bestätigt gefunden.»

der Luft gegriffene Theorie von der Identität der beiden blauen Farbstoffe zu verzichten), benimmt ihn des Urheberrechtes an dieser Entdeckung, ganz besonders des alleinigen.

Aus demselben Grunde ¹⁾ habe ich auch dagegen Einspruch erhoben, daß Herr Ellinger ²⁾ diese Entdeckung Bouma zuschreibt. Zwar meinte ich anfangs, Herr Ellinger ignoriere meine Publikationen, aber, wie er zugesteht, hat er sie nur deshalb nicht zitiert, weil sie sich mit seiner eigenen Anschauung nicht deckten; ³⁾ da möchte ich ihn doch ohne anderweitige Kommentierung darauf hinweisen, daß er sich mir gegenüber derselben Ungerechtigkeit schuldig macht, deren Opfer er selbst seitens eines andern Autors zu sein sich beklagt. ⁴⁾

Aber noch viel erstaunter war ich, als Bouma in einer vom August 1903 datierten Abhandlung ⁵⁾ behauptete, die Überführung des blauen Farbstoffes in den roten sei von ihm selbst nachgewiesen und von Ellinger bestätigt, wobei er meine Untersuchungen gänzlich mit Stillschweigen überging. Angenommen nun auch, meine zusammenfassende Arbeit über «L'indoxyle urinaire» ⁶⁾ sei damals noch nicht in die Hände des Herrn Bouma gekommen und er habe von meinen Vorträgen am 24. April und 12. Juni 1903 in der Société chimique de Paris, am 6. und 20. Juni 1903 in der Société de Biologie noch nicht Kenntnis nehmen können, so konnte dem betreffenden Autor doch meine Mitteilung vom 24. Februar 1902 in Académie des Sciences nicht entgehen. Wie allgemein bekannt

¹⁾ L'Indoxyle etc., p. 34.

²⁾ «Daß . . . auch Indigoblau in Indigorot unter den Bedingungen der Indikanbestimmung übergehen kann, wie Bouma annimmt, soll nicht bestritten werden.» Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S.187.

³⁾ « . . . ich habe sie nur aus dem Grunde nicht zitiert . . . weil ich von der Unrichtigkeit der theoretischen Anschauungen Maillards . . . überzeugt war.» Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 29.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 27.

⁵⁾ « . . . jedoch geschieht die Bildung des Indigorots . . . durch Umbildung von Blau in Rot, wie früher von mir betont, und wie es auch von Ellinger bestätigt worden ist.» Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, S. 364.

⁶⁾ Thèse soutenue devant la Faculté de Médecine de Nancy, le 17 juillet 1903.

diese geworden ist, geht daraus hervor, daß erst nach ihrer Veröffentlichung die Möglichkeit der Überführung des Indigoblau in Indigorot von den Autoren allgemein zugegeben wurde.

Auch meine erste Mitteilung vom Jahre 1901¹⁾ ist in den Augen des Herrn Bouma²⁾ nur eine «Bestätigung» der von ihm erwiesenen Indigonatur des roten Farbstoffes. Offenbar stimmten meine Untersuchungen mit denen Boumas so gut überein, daß man jene von allen früheren Autoren anerkannte Tatsache, die nur zeitweilig in Vergessenheit geraten war, wieder auffrischen konnte. Ich habe hingegen in meiner Mitteilung noch etwas anderes gebracht, nämlich daß man bei schneller Oxydation den blauen Farbstoff, bei langsamer hingegen den roten erhält, und indem ich dieser Tatsache weiter nachforschte, ergab sich mir das allgemeine Gesetz der Polymerisation des Hemiindigotins als roter oder blauer Körper, je nach der Reaktion des angewandten Lösungsmittels.

Sowohl über jene Tatsache, wie über den daraus von mir gezogenen allgemeinen Schluß wird in der letzten Abhandlung Boumas gar nichts erwähnt. Dieser Autor bleibt eben dabei, für sich eine Entdeckung in Anspruch zu nehmen, die er früher aus Mangel an Verständnis abgelehnt hat, und so sehe ich mich nun gezwungen, gegen ein solches Verfahren Einspruch zu erheben; dies, hoffe ich, wird genügen, sodaß ich mich nicht genötigt zu sehen brauche, nochmals und zwar in eindringlicherer Weise aufzutreten.

Ich denke doch, das Arbeitsfeld der biologischen Chemie ist so umfassend, daß jeder mit Ehren sich darauf betätigen kann, ohne die Arbeit anderer mit Stillschweigen übergehen zu müssen.

¹⁾ C. R. Acad. d. Sciences, vol. CXXXII, p. 990, 22 avril 1901.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 356: