

Zur Methodik der quantitativen Bestimmung des Harnindikans.

Von

Dr. T. Imabuchi aus Fukuoka (Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

;(Der Redaktion zugegangen am 10. Juni 1909.)

Die quantitative Bestimmung des Harnindikans beruht bekanntlich, wie die qualitative, auf Spaltung der indoxylschwefelsauren Salze in Indoxyl und Schwefelsäure bzw. Glukuronsäure und Oxydation des Indoxyls zu Indigo. Die Menge des so erhaltenen Indigos bestimmt man auf verschiedenen Wegen, welche auf gravimetrischer, titrimetrischer, kolorimetrischer und spektrophotometrischer Methodik beruhen.

Als Spaltungsmittel bedient man sich meistens konzentrierter Salzsäure. Dagegen sind verschiedene Reagenzien als Oxydationsmittel angegeben worden. Zuerst hatte Jaffé¹⁾ die Chlorkalklösung gebraucht. Dieses Reagens hat, wie Jaffé ausführlich auseinandersetzte, den Nachteil, daß für jede einzelne Bestimmung das Optimum des Chlorkalkzusatzes erst zu ermitteln ist, wenn man Verluste entweder durch eine unzureichende Überführung des Harnindikans in Indigo oder durch eine weitergehende Zerstörung des Indigos vermeiden will. Es ist auch für eine titrimetrische Bestimmung nicht verwertbar. Seit im Jahre 1890 Obermayer²⁾ als Oxydationsmittel Eisenchlorid benutzte, ist es von den meisten Autoren als bestes Reagens angewendet worden. Ellinger³⁾ hat mit diesem Reagens an reinen, wässerigen Indikanlösungen, sowie an Menschen- und Hundeharnen, welchen reines Indikan zugesetzt war, Versuche gemacht und nachgewiesen, daß etwa 86% der berechneten

¹⁾ Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol., Bd. III, S. 448, 1870.

²⁾ Wiener klin. Wochenschrift, 1890, S. 176.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

Menge Indikan wiedergefunden werden. Die Verluste an Indikan hat er der Isatinbildung aus Indoxyl zugeschrieben, welche durch die Bildung von Indigorot nur teilweise ausgeglichen werden. Danach sind verschiedene Mittel zur Überführung des Indoxyls in Indigo verwandt worden: Wasserstoffsuperoxyd (Loubiou),¹⁾ Persulfate, besonders Ammoniumpersulfat (Amann),²⁾ Kaliumchlorat (Stryzowsky),³⁾ statt Obermayers Reagens (Eisenchlorid + Salzsäure) eine Mischung von 2 Tropfen Liquor ferri sesquichlorati in 50 ccm konzentrierter Schwefelsäure (Graziani),⁴⁾ 1 % Osmiumsäurelösung (A. Gürber).⁵⁾ Eine quantitative Methode ist aber auf keine dieser Reaktionen begründet worden.

Im letzten Jahre hat E. Salkowski⁶⁾ auf die Anwendung von Kupfersulfatlösung zum Nachweis des Indikans aufmerksam gemacht. Ob Kupfersulfat + Salzsäure auch für die quantitative Bestimmung anstatt des Obermayerschen Reagens anwendbar sei, ließ er dahingestellt.

Meine Versuche sind darauf gerichtet gewesen, festzustellen, ob das Kupfersulfat für die quantitative Indikanbestimmung vor Obermayers Reagens einen Vorzug habe oder wenigstens diesem substituierbar sei. Zuerst habe ich eine Versuchsreihe von Indikanbestimmungen nach dem von A. Ellinger⁷⁾ modifizierten Verfahren von Wang⁸⁾-Obermayer⁹⁾ gemacht und dabei andere Vorschläge in Betracht gezogen. Dadurch fand ich einige kleine Modifikationen empfehlenswert. Zur vorgängigen Fällung habe ich nach Bouma¹⁰⁾ und Ellinger¹¹⁾

¹⁾ Zitiert n. chem. Zentralbl., 1897, I, S. 620.

²⁾ Zitiert n. chem. Zentralbl., 1898, I, S. 152.

³⁾ Zitiert n. chem. Zentralbl., 1901, II, S. 1181.

⁴⁾ Zitiert n. Malys Jahresbericht, 1898, S. 276.

⁵⁾ Münch. med. Wochenschr., Bd. LII, 1878—79.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 520.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 192.

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 406; Bd. XXVII, S. 139.

⁹⁾ Wiener klin. Rundschau, 1898, S. 537, und Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 135.

¹⁰⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 118.

¹¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 190.

$\frac{1}{10}$ Volumen Liquor plumbi subacetici benutzt. Wie Ellinger,¹⁾ Porcher und Hervieux²⁾ schon nachgewiesen haben, entstehen dadurch keine Verluste an Indikan, wenn der Harn sauer reagiert. Mehrfach habe ich auch den sorgfältig mit Wasser ausgewaschenen Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und auf indigoliefernde Substanzen geprüft. Niemals konnte ich davon eine Spur nachweisen. Zur einmaligen Bestimmung begnügte Obermayer³⁾ sich mit 50 ccm Harnfiltrat, dagegen benutzten Wang⁴⁾ und Bouma⁵⁾ 200—250 ccm. Ellinger⁶⁾ und Salkowski⁷⁾ nahmen meistens davon 100 ccm. Ich habe aus folgenden Gründen nur 50 ccm genommen:

1. Beim Gebrauch von 100 ccm Harnfiltrat fand ich, daß sich manchmal Indigo feinkörnig oder krystallinisch an der Wand des Schütteltrichters absetzte oder der Bleichloridniederschlag, der nicht selten an der Berührungsgrenze der Harnmischung und des Chloroforms entstand, Indigo in sich schloß. Diese Indigoniederschläge gingen nicht leicht in Chloroform über.

2. Beim Benutzen von 50 ccm wird die Indigorotbildung augenscheinlich auf ein Minimum reduziert, wie Obermayer⁸⁾ schon hervorgehoben hatte.

3. Die nachherige Reinigung des Indigos wird sehr erleichtert. Wenn der Harn indikanreich war, verdünnte ich ihn mit Wasser, bis der Indigogehalt von 50 ccm Harnfiltrat zur Titration weniger als 5 ccm der gebrauchten Chamäleonlösung verbrauchte. Bei weniger verdünntem Harn kam es mitunter wieder zu den unangenehmen Ausscheidungen von Indigo.

Das Obermayersche Reagens wurde durch Auflösen von 3 g festem Eisenchlorid in reiner konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 hergestellt.

Über den Zeitpunkt der Mischung von Harnfiltrat und

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 190.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 148.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 428.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 135.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 123.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 191.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 236.

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 428.

Obermayers Reagens mit Chloroform sind die Ansichten geteilt. Wang¹⁾ und Ellinger²⁾ erhielten die größte Menge Indigo, wenn sie sogleich extrahierten, Bouma³⁾ hielt es für das beste, nach dem Zusatz des Reagens wenigstens eine halbe Stunde zu warten.

E. Salkowski⁴⁾ schüttelte die Mischung mit Chloroform nach etwa 5—10 Minuten. Ich habe nach 3 verschiedenen Zeiten mit Chloroform geschüttelt und fand in Übereinstimmung mit Wang und Ellinger, daß sofortiges Ausschütteln die größte Menge Indigoblau lieferte. Die folgende Tabelle zeigt es:

	Spez. Gewicht	Reaktion	Die Menge des Indigo in 50 ccm		
			so- gleich	nach 10 Min.	nach 30 Min.
1. Menschenharn (mit Chloroform konserviert)	1020	sauer	0,4290	0,3850	0,3520
2. Menschenharn (frisch)	1016	•	0,6105	0,5748	0,5500
3. Menschenharn (frisch)	1011	schwach sauer	0,3163	0,2998	0,2916
4. Hundeharn (mit Chloroform konserviert)	1033	schwach alkalisch	0,5508	0,5225	0,5060

Bei der oben angeführten Verdünnung und Mengenabmessung des Harnfiltrats genügen 3—4 Ausschüttelungen und jedesmal ein etwa 2 Minuten langes Schütteln. Um den Indigo möglichst schnell auszuziehen, habe ich zuerst 50 ccm Chloroform benutzt und dann jedesmal etwa 20 ccm. Die Auszüge werden in einem anderen Schütteltrichter gesammelt und einige Zeit sich selbst überlassen. Die in den Auszügen noch vorhandenen Harntropfchen fließen dann zu größeren zusammen und bleiben jetzt beim Ablassen des Chloroforms an der Wand haften.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 580.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 188.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 123.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 236.

Die Auszüge wurden danach durch ein kleines trockenes Filter in einen trockenen, sorgfältig gereinigten Kolben filtriert, um sicher zu sein, daß keine Salzsäure in den Kolben gelangt. Dabei zieht manchmal etwas Indigolösung in den Rand des Filters ein, sodaß derselbe spurweise blau erscheint. Um keinen Verlust an Indigo zu erleiden, wurden der Schütteltrichter und das Filter zum Schluß mit etwa 20 ccm Chloroform nachgespült. Wie Salkowski¹⁾ schon an Rinderharn beobachtet hatte, bemerkte ich auch in den unteren Partien des Filters eine leichte Rosafärbung, die durch mehrmaliges Waschen mit Chloroform nicht zu beseitigen war. Diese Rosafärbung ist besonders beim alten Menschenharn zu beobachten. Die abfiltrierten Chloroformlösungen wurden auf dem Wasserbade im liegenden, offenen Kolben noch 5 Minuten lang getrocknet.

Der trockene Rückstand roch nach p-Kresol und enthielt noch viele Beimengungen. Also muß er vor der weiteren Behandlung erst gereinigt werden.

Bezüglich dieser Reinigung sind verschiedene Verfahren angegeben worden. Obermayer²⁾ reinigt den Rückstand durch 45%igen Alkohol, Wang³⁾ durch Behandlung mit einem Gemisch gleicher Teile Alkohol, Äther und Wasser. Diese beiden Verfahren haben den Effekt, daß sich Indigoblau fast ganz ablöst und außerdem Indigorot in Lösung geht, wie Bouma⁴⁾ Ellinger,⁵⁾ Salkowski⁶⁾ und Grosser⁷⁾ beobachtet haben. Es ist ein sehr unangenehmes Vorkommnis. Ellinger⁸⁾ reinigt den Indigorückstand durch Behandlung mit heißem Wasser. Maillard⁹⁾ hat angegeben, die Chloroformlösung des Indigos vor der Destillation durch Schütteln mit verdünnter Natronlauge zu reinigen, ich habe davon keinen Vorteil gesehen, es war

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 237.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 427.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 138.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 125.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 188.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 239.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 320.

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 193.

⁹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 437.

trotzdem öfters noch Waschung des Verdampfungsrückstandes des Chloroformauszuges erforderlich.

Ich habe nach dem Verfahren von Ellinger mit heißem Wasser gereinigt und zwar folgendermaßen. Man gießt ca. 30 ccm heißes Wasser der Wand entlang ein, schwenkt es leicht um und läßt es einige Minuten lang stehen. Diese Waschung wird 3—4 mal wiederholt, bis das letzte Waschwasser Kaliumpermanganatlösung nicht mehr entfärbt. Das erste Waschwasser ist goldgelb gefärbt und zeigt dichte Trübung mit Bromwasser und intensive Millonsche Reaktion. Das zweite ist fast farblos, zeigt keine Trübung mit Bromwasser und nur schwache Millonsche Reaktion, aber entfärbt noch deutlich Permanganatlösung. Also muß der Rückstand noch farblose, oxydierbare Substanzen enthalten. Um es zu entscheiden, wievielmale Waschungen nötig sind, um alle oxydierbaren Substanzen zu entfernen, habe ich nach dem Vorgange von E. Salkowski zu den Waschwassern Indigokarminlösung von bekanntem Gehalt zugesetzt und geprüft, ob die Mischung mehr Kaliumpermanganat zur Oxydation braucht, wie die Indigokarminlösung allein.

Die Lösung des Indigokarmins war so verdünnt, daß 10 ccm derselben 5,5 ccm der $\frac{1}{400}$ -n-Kaliumpermanganatlösung bis zur Entfärbung verbrauchten. Jedem Waschwasser wurden 10 ccm Indigokarminlösung und 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt. Die Mischung wurde etwa 5 Minuten lang auf dem Wasserbade erhitzt, abgekühlt, dann mit Wasser auf 110 ccm aufgefüllt und mit Kaliumpermanganatlösung titriert. Das Resultat war folgendes:

1. Hundeharn.

Waschwasser	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm im ganzen	Somit zur Oxydation der im Waschwasser vorhandenen Substanzen verbraucht
1.	7,5	2,0
2.	5,8	0,3
3.	5,5	0,0
4.	5,5	0,0

2. Menschenharn.

Waschwasser	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm	Verbrauch von derselben zur Oxydation der im Waschwasser vorhandenen Substanzen
1.	9,5	4,0
2.	6,0	0,5
3.	5,65	0,15
4.	5,5	0,0

Die Zahlen dieser Tabellen sind Mittelzahlen aus mehreren Bestimmungen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei dem oben angeführten Verfahren 3—4 malige Waschungen genügen, um alle in heißem Wasser löslichen, oxydablen Substanzen zu entfernen.

Der mit heißem Wasser ausgewaschene Indigo wurde nach Abgießen des Wassers mit 10 ccm reiner, konzentrierter Schwefelsäure, die Kaliumpermanganatlösung nicht entfärben darf, aufgenommen, und zur vollständigen Lösung 5—10 Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt. Die anfangs olivgrüne Lösung wird mit der Zeit rein blau. Dieser Farbenwechsel entspricht genau dem bei der Bereitung von Indigosulfosäure aus reinem Indigo auftretenden. Die Schwefelsäurelösung wurde nach dem Erkalten mit 100 ccm destilliertem Wasser verdünnt, und die so entstandene blaue Lösung war bei meinen Versuchen stets vollständig klar. Nur wenn das Wasser vor dem Erkalten eingegossen wird, bekommt man eine geringe Trübung, und diese erschwert das Erkennen des Endpunktes der Titration. Niemals habe ich eine Flockenbildung des Indigos bemerkt, wie Wang¹⁾ hervorgehoben hatte. Die warme, verdünnte Indigosulfosäurelösung wird titriert. Zur Titration diene $\frac{1}{400}$ N-Kaliumpermanganatlösung. 1 ccm derselben entspricht nach der Wangschen Angabe 0,165 mg Indigo. Nach Ellinger²⁾ ist es zwar notwendig, die Kaliumpermanganatlösung auf reines

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 408.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 184.

Indigoblau zu stellen; da es sich bei meinen Versuchen nur um Vergleichungswerte handelte, beschränkte ich mich auf die angegebene, nicht direkt gestellte Lösung. Die Endreaktion beim Titrieren war stets scharf, die Lösung nach Beendigung der Titration nur schwach gelb.

Was nun das Verfahren der Indikanbestimmung mit Kupfersulfat und Salzsäure anbelangt, so ist es fast gleich dem mit Obermayers Reagens. Statt dessen versetzt man nur das Harnfiltrat mit gewöhnlich gebrauchter Kupfersulfatlösung (1 : 10) und setzt dazu das gleiche Volumen konzentrierter Salzsäure von spezifischem Gewicht 1,19.

Ich habe diese Versuche an 4 verschiedenen frischen Menschenharnen, einem alten Menschenharn und einem alten Hundeharn gemacht und zuerst nur 1 ccm der Kupfersulfatlösung benutzt. Die Durchschnittswerte von 3 Bestimmungen an jedem Harn sind folgende:

I. Versuchsreihe.

1. Frischer Menschenharn.

Reaktion sauer, spezifisches Gewicht 1015, gesamte Tagesmenge 2270 ccm. 500 ccm mit 50 ccm Bleiessig gefällt. Vom Filtrat verbrauchten die mit Obermayers Reagens behandelten 50 ccm 3,5 ccm Kaliumpermanganatlösung, 50 ccm Harn verbrauchen 3,85, enthalten also 0,635 mg Indigo. Die anderen, mit 1 ccm Kupfersulfatlösung und Salzsäure behandelten 50 ccm Harnfiltrate verbrauchten 3,58 ccm Permanganatlösung. Also verbrauchen 50 ccm Harn 3,93 ccm, und zwar enthalten sie 0,649 mg Indigo, also etwa 2 % mehr als die vorigen, was als in die Fehlergrenzen fallend anzusehen ist.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Menge des Indigo in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	3,85	0,635
mit Kupfersulfat + Salz- säure behandelt	3,93	0,649

2. Frischer Menschenharn.

Reaktion sauer, spezifisches Gewicht 1016, gesamte Tagesmenge 2310 ccm; Fällung wie oben. 50 ccm Harnfiltrate, mit Obermayers Reagens behandelt, verbrauchten 3,65 ccm Permanganatlösung. 50 ccm Harn verbrauchten 4,02 ccm, enthalten also 0,663 mg Indigo. Die anderen, mit Kupfersulfat-säure behandelten, verbrauchten 3,75, 50 ccm Harn verbrauchten 4,13 ccm, enthalten 0,681 mg Indigo, also 2,7% mehr als die vorigen.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Indigomenge in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	4,02	0,663
mit Kupfersulfat + Salz- säure behandelt	4,13	0,681

3. Frischer Menschenharn.

Reaktion schwach sauer, spezifisches Gewicht 1012, gesamte Tagesmenge 2370 ccm; Fällung wie oben. 50 ccm Filtrate, mit Obermayers Reagens behandelt, verbrauchten 1,85 ccm Chamäleonlösung; also verbrauchten 50 ccm Harn 2,03 ccm, entsprechend 0,335 mg Indigo. Die mit Kupfersulfat + Salzsäure behandelten 50 ccm Harnfiltrate verbrauchten 1,9 ccm; also verbrauchen 50 ccm Harn 2,09 mg, entsprechend 0,345 mg Indigo, d. h. etwa 3% mehr als die vorigen.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Indigomenge in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	2,03	0,335
mit Kupfersulfat + Salz- säure behandelt	2,09	0,345

4. Frischer Menschenharn.

Reaktion schwach sauer, spezifisches Gewicht 1011, gesamte Tagesmenge 1860 ccm; Fällung wie oben. 50 ccm Fil-

trate, mit Obermayers Reagens behandelt, verbrauchten 1,90 ccm Chamäleonlösung. 50 ccm Harn verbrauchten 2,09 ccm, entsprechend 0,345 mg Indigo. Die mit Kupfersulfat + Salzsäure behandelten 50 ccm Filtrate verbrauchten 2,0 ccm Chamäleonlösung, 50 ccm Harn verbrauchen 2,2 ccm, entsprechend 0,363 mg Indigo, d. h. etwa 5 % mehr als die vorigen.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Indigomenge in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	2,09	0,345
mit Kupfersulfat + Salzsäure behandelt	2,20	0,363

5. Alter Menschenharn (mit Chloroform konserviert).

Reaktion schwach sauer, spezifisches Gewicht 1020. Fällung wie oben. Vom Filtrate verbrauchten die mit Obermayers Reagens behandelten 50 ccm 2,6 ccm Chamäleonlösung; also verbrauchen 50 ccm Harn 2,86 ccm und enthalten 0,472 mg Indigo. Die mit Kupfersulfat + Salzsäure behandelten 50 ccm Harnfiltrat verbrauchten 2,7 ccm; 50 ccm Harn verbrauchen 2,97 ccm, entsprechend 0,49 mg Indigo, d. h. 4,7 % mehr als die vorigen.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Indigomenge in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	2,86	0,472
mit Kupfersulfat + Salzsäure behandelt	2,97	0,490

6. Alter Hundeharn (mit Chloroform konserviert).

Reaktion schwach alkalisch, spezifisches Gewicht 1033, mit Essigsäure schwach angesäuert. 200 ccm Harn wurden mit 600 ccm Wasser verdünnt und mit 40 ccm Bleiessig gefällt. Vom Filtrate verbrauchten 50 ccm, mit Obermayers Reagens

behandelt, 3,8 ccm Chamäleonlösung, also verbrauchen 50 ccm Harn 15,96 ccm und enthalten 2,63 mg Indigo. Die anderen, mit Kupfersulfat und Salzsäure behandelten 50 ccm Filtrate verbrauchten 3,85 ccm Chamäleonlösung, also verbrauchen 50 ccm Harn 16,28 ccm und enthalten 2,69 mg Indigo; d. h. etwa 2,2 % mehr als die vorigen.

50 ccm Harn	Verbrauch von Kalium- permanganat in ccm	Indigomenge in mg
mit Obermayers Reagens behandelt	15,96	2,63
mit Kupfersulfat + Salz- säure behandelt	16,28	2,69

Die vorigen Bestimmungen zeigen, daß man durch die Behandlung mit Kupfersulfat und Salzsäure etwas mehr Indigo bekommt, als bei Obermayers Reagens, und zwar je höher der Indikangehalt ist, desto größer ist die Differenz.

Aber der große Überschuß an Kupfersulfat und die längere Einwirkung bedingen etwas Verlust an Indigo. Davon liefern die folgenden Bestimmungen ein anschauliches Bild.

II. Versuchsreihe.

1. Frischer Menschenharn.

Derselbe Harn wie in I. Versuchsreihe 1. Die Fällung wie gewöhnlich. Vom Filtrate wurden 50 ccm mit je 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 ccm Kupfersulfatlösung und dem gleichen Volumen Salzsäure behandelt. Die dadurch erhaltenen Indigomengen waren folgende:

Die Menge des Zusatzes von Kupfersulfatlösung in 50 ccm Harnfiltrat ccm	Verbrauch von Kalium- permanganat in ccm	Die Menge von Indigo in mg
0,5	3,36	0,55
1,0	3,5	0,58
2,0	3,53	0,58
3,0	3,53	0,58
5,0	3,29	0,54

2. Frischer Menschenharn.

Derselbe Harn wie in I. Versuchsreihe 2. Die Behandlung wie oben.

Die Menge des Zusatzes von Kupfersulfatlösung in 50 ccm Harnfiltrat ccm	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Menge von Indigo in mg
0,5	3,50	0,58
1,0	3,75	0,62
2,0	3,75	0,62
3,0	3,70	0,61
5,0	3,40	0,56

3. Frischer Menschenharn.

Derselbe Harn wie in I. Versuchsreihe 3. Die Behandlung wie oben.

Menge des Zusatzes von Kupfersulfatlösung in 50 ccm Harnfiltrat ccm	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Menge von Indigo in mg
0,5	1,85	0,31
1,0	1,90	0,31
2,0	1,85	0,31
3,0	1,85	0,31
5,0	1,75	0,29

4. Alter Menschenharn (mit Chloroform konserviert).

Derselbe Harn wie im I. Versuch 5. Die Behandlung wie oben.

Menge des Zusatzes von Kupfersulfatlösung in 50 ccm Harnfiltrat ccm	Verbrauch von Kaliumpermanganat in ccm	Menge von Indigo in mg
0,5	2,45	0,40
1,0	2,60	0,43
2,0	2,63	0,43
3,0	2,55	0,42
5,0	2,30	0,38

Aus dem Vorigen geht hervor, daß der Gebrauch von 1—3 ccm Kupfersulfatlösung fast gar nichts am Resultate ändert, während 0,5 ccm zur Überführung alles Indikans ungenügend sind und 5 ccm schon zur Überoxydation führen.

Dabei habe ich bemerkt, daß die Extraktion durch Chloroform beim Benutzen von 2—3 ccm Kupfersulfatlösung leichter vonstatten geht als bei 1 ccm.

In folgenden Versuchen habe ich deshalb 1—3 ccm Kupfersulfatlösung gebraucht.

III. Versuchsreihe.

1. Frischer Menschenharn.

Derselbe Harn wie in I. Versuchsreihe 1. Fällung wie oben. Vom Filtrate wurden je 50 ccm mit 1,0, 2,0, 3,0 ccm Kupfersulfatlösung und dem gleichen Volumen Salzsäure versetzt und sofort, sowie nach 10, 30, 60 Minuten mit Chloroform extrahiert. Die Resultate sind folgende:

Menge der zugesetzten Kupfersulfatlösung	1 ccm	2 ccm	3 ccm
Zeit der Ausschüttelung	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm		
sofort	3,45	3,55	3,5
nach 10 Minuten	3,5	3,55	3,5
» 30 »	3,5	3,40	3,3
» 60 »	3,5	3,20	3,2

2. Frischer Menschenharn.

Derselbe Harn wie in I. Versuchsreihe 4. Die Behandlung wie oben.

Menge der zugesetzten Kupfersulfatlösung	1 ccm	2 ccm	3 ccm
Zeit der Ausschüttelung	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm		
sofort	2,00	2,00	1,95
nach 10 Minuten	2,00	2,00	1,95
> 30 >	1,90	1,90	1,80
> 60 >	1,70	1,70	1,70

3. Alter Hundeharn (mit Chloroform konserviert).

Derselbe Harn wie I. Versuchsreihe 6. Der Harn mit Wasser 4fach verdünnt, mit $\frac{1}{20}$ Volumen Bleiessig gefällt. Die weitere Behandlung wie oben.

Menge der zugesetzten Kupfersulfatlösung	1 ccm	2 ccm	3 ccm
Zeit der Ausschüttelung	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm		
sofort	3,8	3,85	3,85
nach 10 Minuten	3,9	3,9	3,85
> 30 >	3,9	3,9	3,90
> 60 >	3,7	3,7	3,60

Die dritte Versuchsreihe zeigt, daß man beim Gebrauch von 1—2 ccm Kupfersulfatlösung die Harnfiltratreagensmischung bis zu 10 Minuten stehen lassen kann, ohne dabei eine Überoxydation befürchten zu müssen, während bei 30 Minuten langem Stehen schon etwas Verlust an Indigo eintritt. Besonders ist dies der Fall beim indikanarmen Harn, wie es leicht begreiflich ist. Da der Raumersparnis halber im Vorstehenden nur Mittelzahlen angegeben sind, so seien des Beispiels halber hier noch 2 Versuchsprotokolle direkt mitgeteilt, welche zeigen, daß die Einzelablesungen sehr nahe aneinander liegen. Die Beziehung zu den oben mitgeteilten Tabellen ist leicht ersichtlich.

I.

Menge des Zusatzes von Kupfersulfat- lösung in 50 ccm Harnfiltrat ccm	Verbrauch von Kalium- permanganat in ccm
0,5	1. 3,4 2. 3,4 Mittel 3,36 3. 3,3
1,0	1. 3,5 2. 3,55 Mittel 3,5 3. 3,5
2,0	1. 3,5 2. 3,6 Mittel 3,53 3. 3,5
3,0	1. 3,5 2. 3,6 Mittel 3,53 3. 3,5
5,0	1. 3,25 2. 3,3 Mittel 3,29 3. 3,3
0,5	1. 3,55 2. 3,45 Mittel 3,5 3. 3,5
1,0	1. 3,75 2. 3,75 Mittel 3,75 3. 3,8
2,0	1. 3,8 2. 3,75 Mittel 3,76 3. 3,75
3,0	1. 3,7 2. 3,65 Mittel 3,68 3. 3,7
5,0	1. 3,35 2. 3,4 Mittel 3,4 3. 3,45

II.

Menge der zugesetzten Kupfersulfatlösung	1 ccm	2 ccm	3 ccm
Zeit der Ausschüttelung	Verbrauch von Kaliumpermanganatlösung in ccm		
sofort	1. 3,4	3,55	3,5
	2. 3,5	3,55	3,55
	Mittel 3,45	3,55	3,53
nach 10 Minuten	1. 3,5	3,6	3,5
	2. 3,5	3,5	3,5
	Mittel 3,5	3,55	3,5
nach 30 Minuten	1. 3,5	3,4	3,2
	2. 3,6	3,45	3,4
	Mittel 3,55	3,43	3,3
nach 60 Minuten	1. 3,5	3,3	3,2
	2. 3,45	3,1	3,2
	Mittel 3,48	3,2	3,2
sofort	1. 2,00	2,0	1,9
	2. 1,95	2,0	2,0
	Mittel 1,98	2,0	1,95
nach 10 Minuten	1. 2,05	1,95	1,95
	2. 1,95	2,0	1,95
	Mittel 2,0	1,98	1,95
nach 30 Minuten	1. 1,95	1,95	1,85
	2. 1,9	1,85	1,8
	Mittel 1,93	1,9	1,83
nach 60 Minuten	1. 1,7	1,7	1,7
	2. 1,75	1,7	1,65
	Mittel 1,73	1,7	1,68
sofort	1. 3,85	3,85	3,85
	2. 3,7	3,85	3,85
	Mittel 3,78	3,85	3,85
nach 10 Minuten	1. 3,9	3,9	3,9
	2. 3,9	3,95	3,8
	Mittel 3,9	3,93	3,85
nach 30 Minuten	1. 3,85	3,9	3,85
	2. 3,9	3,9	3,9
	Mittel 3,88	3,9	3,9
nach 60 Minuten	1. 3,7	3,8	3,55
	2. 3,7	3,65	3,65
	Mittel 3,7	3,73	3,6

Nach den oben angeführten Versuchsreihen ist es berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß man sich zur quantitativen Bestimmung des Harnindikans statt Eisenchlorids der Kupfersulfatlösung bedienen kann; letzteres hat in folgenden Punkten Vorzüge:

1. Kupfersulfat gibt etwas mehr Indigo als Eisenchlorid, obwohl die Pluszahl nicht immer konstant ist.

2. Beim Gebrauch von Kupfersulfat kann man die Ausschüttelung der Harnfiltratreagensmischung mit Chloroform wenigstens 10 Minuten verschieben, während bei Anwendung von Eisenchlorid immer sofort ausgeschüttelt werden muß.

3. Durch Benutzung von Kupfersulfat kommt ein für einen speziellen Zweck gebrauchtes Obermayers Reagens in Fortfall.

4. Ein Überschuß von Reagens schadet bei Kupfersulfat weniger als bei Eisenchlorid.

Die Ausführung der Bestimmung im Menschen- oder Hundeharn sei hier noch einmal zusammengefaßt.

1. Der Harn wird mit $\frac{1}{10}$ Volumen Liquor ferri subacetici gefällt. Wenn der Harn nicht mehr sauer oder alkalisch reagiert, muß man ihn vorher mit Essigsäure schwach ansäuern.

2. Man versetzt 50 ccm des Harnfiltrats in einem Schütteltrichter mit 1—2 ccm der gewöhnlich gebrauchten Kupfersulfatlösung (1 : 10) und setzt dazu das gleiche Volumen konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19. Wenn der Harn indikanreich ist, muß er mit destilliertem Wasser verdünnt werden, bis der Indigogehalt von 50 ccm Harnfiltrat zur Titration weniger als 5 ccm Chamäleonlösung verbraucht.

3. Die Harnfiltratreagensmischung wird nach einigen Minuten (etwa 5—10 Minuten) mit Chloroform ausgeschüttelt. Um den Indigo möglichst schnell auszuziehen, soll man zuerst 50 ccm Chloroform benutzen und dann jedesmal 20 ccm. 3—4 Ausschüttelungen genügen — jedesmal ein etwa zwei Minuten langes Schütteln —, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt.

4. Die abgelassenen Chloroformlösungen bleiben in einem andern Schütteltrichter einige Minuten stehen und werden durch

ein trockenes Filter in einen trockenen, gründlich gereinigten Kolben filtriert.

5. Das Chloroform wird auf dem Wasserbad abdestilliert und der Rückstand auf dem Wasserbad noch etwa 5 Minuten lang getrocknet.

6. Der trockene Rückstand wird mit heißem Wasser 3—4mal ausgewaschen, indem man ca. 30 ccm heißes Wasser der Wand entlang eingießt, es leicht umschwenkt und dann einige Minuten lang stehen läßt, jedenfalls so lange, bis das letzte Waschwasser Chamäleonlösung nicht mehr entfärbt.

7. Der gereinigte Indigo wird nach Abgießen des Wassers mit 10 ccm reiner, konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und dann 5—10 Minuten lang auf dem kochenden Wasserbade erwärmt.

8. Nach dem Erkalten wird die Schwefelsäurelösung mit etwa 100 ccm destilliertem Wasser verdünnt und mit Chamäleonlösung titriert.

