

## XVIII.

# Kleinere Mittheilungen physiologisch-chemischen Inhaltes (III).

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Prof. E. Salkowski.

Ich gebe unter diesem Titel eine Reihe von Notizen, die sich in ihrer Form an die unter gleichem Titel erschienenen in Pflüger's Arch. Bd. IV. S. 91 und Bd. VI. S. 207 anschliessen.

## 1. Ueber die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn.

Ich habe vor einigen Jahren darauf hingewiesen<sup>1)</sup>, dass die Ausfällung der Harnsäure aus dem Harn durch Salzsäure nicht so vollständig ist, wie man in der Regel annimmt, dass ausserdem aber — und das ist offenbar der wichtigere Punkt — Urine vorkommen, in denen die Ausfällung sehr unvollständig ist. Die Methode ist also nicht mit einem constanten, sondern wechselnden Fehler behaftet. Diese Wahrnehmung ist seitdem von Maly<sup>2)</sup> und von Fokker<sup>3)</sup> bestätigt worden. Ich habe weiterhin l. c. zum Zweck einer genauen Harnsäurebestimmung empfohlen, das salzsaure Filtrat von der Harnsäurebestimmung mit Ammoniak oder besser mit ammoniakalischer Magnesiamischung zu versetzen, von dem Niederschlag abzufiltriren und das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung zu fällen — ein Verfahren, das sich auf die Schwerlöslichkeit der Doppelverbindungen der Harnsäure mit Silber und einer 2ten Base stützt. Die betreffenden Verbindungen sind seitdem von Maly (l. c.) genauer untersucht und in Uebereinstimmung mit mir als sehr brauchbar für die quantitative Bestimmung der Harnsäure und auch für den Nachweis derselben anerkannt worden. Die Brauch-

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv Bd. V. S. 210.

<sup>2)</sup> Ebendas. Bd. IV. S. 201.

<sup>3)</sup> Ebendas. Bd. X. S. 153.

barkeit in letzterer Beziehung hatte ich inzwischen wiederholt zu erproben Gelegenheit gehabt: ich habe die Fällung mit Silberlösung vielfach zur Untersuchung von Blut und Gewebsauszüge auf Harnsäure angewendet. Es gelang mir u. A. mit Hülfe derselben der Nachweis von Harnsäure in einer kleinen Menge Blut eines Arthritikers. Was die chemische Natur des unter den angegebenen Bedingungen entstehenden Niederschlages betrifft, so hat Maly den bestimmten Nachweis geführt, dass es sich um Doppelverbindungen handelt, ich habe indessen in meiner ersten Publication<sup>1)</sup> über diesen Gegenstand auch schon gesagt „übrigens scheint der Niederschlag nicht reines harnsaures Silberoxyd zu sein, sondern noch Basen in fester chemischer Bindung zu enthalten“. In der 2. Mittheilung habe ich die Anwendung ammoniakalischer Magnesiämischung empfohlen in der Absicht, dadurch die Bildung von harnsaurer Silbermagnesia zu ermöglichen, welche Verbindung mir eine besondere Beständigkeit zu haben schien. Mein Verfahren zur Harnsäurebestimmung muss nun wohl als das zur Zeit genaueste gelten, allein es ist — namentlich für klinische Zwecke — viel zu umständlich.

Ich habe mich nun verschiedentlich bemüht, die Methode handlicher zu machen und namentlich sie zu einer Titrimethode umzugestalten — solche Versuche schlossen sich fast regelmässig an mir obliegende Bestimmungen der Harnsäure an, da ich jedesmal meine Methode zu umständlich fand — allein ich bin zu keinem befriedigenden Resultat gelangt. Um so willkommener musste mir daher ein vor Kurzem von Fokker veröffentlichtes Verfahren sein, das die Fällung mit Salzsäure ganz umgeht und auf der Schwerlöslichkeit des harnsauren Ammoniak in Wasser beruht. Fokker verfährt folgendermaassen: 100 Ccm. Harn werden mit kohlensaurem Natron stark alkalisch gemacht, nach etwa 6 Stunden die ausgeschiedenen Erdphosphate abfiltrirt und mit heissem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden mit 10 Ccm. concentrirter Salmiaklösung versetzt und nach 12 Stunden das ausgeschiedene harnsaure Ammoniak auf einem gewogenen Filter gesammelt. Vor der Wägung führt man es durch Behandeln mit schwacher Salzsäure (1:10) in Harnsäure über. Zu dem gefundenen Werth addirt man nach Vf.

<sup>1)</sup> Dieses Archiv Bd. LII. S. 58.

noch 16 Milligr. Harnsäure hinzu, entsprechend der Löslichkeit des harnsauren Ammoniak in Wasser.

Bei der Prüfung des Verfahrens ergab sich nun zunächst, dass die von Fokker angegebene Zeit zur Fällung des harnsauren Ammoniak auch bei sehr kühler Temperatur nicht ausreichte: es entstand im Filtrat regelmässig ein neuer, nicht unbeträchtlicher Niederschlag — man muss daher der Fällung mindestens 24, besser 48 Stunden Zeit lassen. Filtrirt man nach dieser Zeit ab, so scheidet sich aus dem Filtrat nichts weiter ab und dasselbe giebt mit ammoniakalischer Silberlösung in der That nur einen unbedeutenden Niederschlag, wie die weiter unten folgenden Doppelbestimmungen zeigen. Ferner muss ich hervorheben, dass beim Behandeln des harnsauren Ammon auf dem Filter mit verdünnter Salzsäure wohl stets etwas Harnsäure in Lösung geht und sich aus dem Filtrat bei längerem Stehen krystallinisch ausscheidet. Fokker sucht zwar die Filtration zu verhindern, doch wird sich stets etwas Harnsäure in der Trichterröhre ausscheiden. Man darf diese Ausscheidung nicht vernachlässigen; ihre Menge betrug in einem Fall, in dem sie gesondert bestimmt wurde 0,012 Grm. Ich führe nun die Zahlen der erwähnten Doppelbestimmungen an: a bezeichnet die in Form von Ammoniaksalz gefällte Harnsäure, b die aus dem Filtrate durch Silberlösung gefällte. Dabei wurde das Filtrat vom harnsauren Ammoniak mit Ammoniak und Magnesiamischung versetzt, in anderen Fällen auch nur mit Ammoniak und dann ohne vorgängige Filtration Silberlösung hinzugesetzt.

		Harnsäure	
		a	b
No. 1.	Normaler Harn 100 Ccm.	0,027	0,014
No. 2.	Fieberharn 100 -	0,077	0,085
No. 3.	Diabetischer Harn 100 -	0,033	0,015
No. 4.	Normaler Harn 200 -	0,0795	0,024
No. 5.	Fieberharn 200 -	0,268	0,018

In dem diabetischen Harn (Zuckergehalt 2,6 pCt.) hatte schon eine ansehnliche Ausscheidung von freier Harnsäure stattgefunden. Bei No. 2 (Fieberharn) bestand ein starkes Sediment von harnsauren Salzen — es wurde durch Erwärmen gelöst, doch schieden sich bei Zusatz von kohlensaurem Natron auf's Neue harnsaure Salze aus — vielleicht in Folge stärkeren Gehaltes des Harns an Ammon-

salzen —, die somit der Bestimmung entgingen. Dieser Fall kann offenbar öfters eintreten.

Es fragte sich nun, ob man diesen Fehler nicht dadurch sicher ausschliessen könne, dass man den Harn mit kohlensaurem Natron und dann sofort, ohne vorher zu filtriren, mit Salmiak versetzt. Gleichzeitig wird dadurch die Methode wesentlich vereinfacht. Drei Doppelbestimmungen nach dem ursprünglichen Fokker'schen Verfahren und nach dem so modificirten, stets mit Bestimmung des gelöst bleibenden Antheils durch Silberlösung, zeigten nun in der That die Zulässigkeit dieses Verfahrens.

No. 6. Normaler Harn; je 150 Ccm.

I nach Fokker a) 0,090 b) 0,0195 c) zusammen: 0,1095

II modificirt a) 0,085 b) verloren gegangen.

No. 7. Normaler Harn; je 200 Ccm.

I nach Fokker a) 0,061 b) 0,0307 c) zusammen: 0,0917

II modificirt a) 0,064 b) 0,0335 c) zusammen: 0,0975.

No. 8. Normaler Harn; je 200 Ccm.

I nach Fokker a) 0,0870 b) 0,0175 c) 0,1045

II modificirt a) 0,0915 b) 0,0135 c) 0,1050.

Die Uebereinstimmung kann als genügende gelten und man kann sich also eine Filtration ersparen. Die durch die Silbermethode erhaltene Harnsäure wurde 2mal mit Wasser, dann mit Alkohol, schliesslich, um beigemischten Schwefel zu entfernen, mit reinem Schwefelkohlenstoff gewaschen; nach der Wägung wurde sie verascht und etwa bleibende Asche in Abzug gebracht, die Werthe sind etwas schwankend, vielleicht abhängig von der verschiedenen Temperatur. Der Harn No. 8 hatte mit dem Niederschlag 3mal 24 Stunden lang dauernd in Eis gestanden; die Zahl für die b-Harnsäure ist dadurch sehr herabgedrückt.

Ich würde nach meinen bisherigen Erfahrungen also folgendes Verfahren vorschlagen: 200 Ccm. Harn werden mit kohlensaurem Natron stark alkalisch gemacht (etwa 10 Ccm. der concentrirten Lösung), nach etwa 1 Stunde 20 Ccm. concentrirte Salmiaklösung hinzugesetzt, 48 Stunden bei kühler Temperatur stehen gelassen, durch ein gewogenes Filter abfiltrirt und 2—3mal gewaschen; alsdann das Filter voll verdünnter Salzsäure gegossen (1 Theil officinelle Säure auf 10 Theile Wasser), und das Filtrat aufgefangen; das Aufgiessen von Salzsäure wird noch mehrmals wiederholt, bis, wie der Augenschein leicht lehrt, alles harnsaure

Ammoniak in Harnsäure übergegangen ist. Das Filtrat bleibt etwa 6 Stunden stehen; die nach dieser Zeit ausgeschiedene Harnsäure wird auf dasselbe Filter gebracht. Man wäscht 2mal mit Wasser, dann mit Alkohol bis zum Verschwinden der sauren Reaction, trocknet bei 110°. Zu der erhaltenen Zahl addirt man 0,030 hinzu. Handelt es sich um sehr dünne Harnen, so wird man gut thun, sie bis zum spec. Gew. 1017—1020 einzudampfen. Ob auch bei dieser Methode ähnliche Ausnahmen vorkommen, wie bei der Salzsäurefällung, können nur weitere Beobachtungen lehren.

## 2. Ueber die Bildung unlöslicher Niederschläge im Körper.

Das Studium der Urämie würde ohne Zweifel durch ein Verfahren gefördert werden, welches gestattete, die Function der Niere allmählich und ohne operativen Eingriff auszuschliessen. Es liegt nahe, zu diesem Zweck die Einführung von Salzen zu versuchen, welche, auf einander einwirkend, einen unlöslichen Niederschlag geben. Man hat nicht zu befürchten, dass die Bildung dieses Niederschlages schon im Blut erfolgt. Denn einerseits wird die Menge der in einem gegebenen Moment gleichzeitig im Blut vorhandenen, auf einander einwirkenden Substanzen, immer nur gering sein, andererseits kommt dem Blut und den Gewebsflüssigkeiten in ziemlich hohem Grade das Vermögen zu, unlösliche Salze in Lösung zu halten. Ich erinnere nur an den Gehalt des alkalischen Blutserum an gelöstem phosphorsaurem Kalk. In der That haben auch die Angaben von Onsum<sup>1)</sup>, dass sich bei der Oxalsäurevergiftung oxalsaurer Kalk, bei der Barytvergiftung schwefelsaures Baryt im Blut bilde und Embolien verursache, durch M. Cyon<sup>2)</sup> wenigstens keine Bestätigung erfahren. Weit günstiger für die Bildung von Niederschlägen liegen die Verhältnisse in den Nieren. Hier finden sich die auf einander einwirkenden Substanzen im gegebenen Augenblick auf einen weit kleineren Raum zusammengedrängt, hier fällt auch das Lösungsmittel zum grössten Theil fort — ich sage zum grössten Theil, denn ganz ohne lösenden Einfluss auf sonst als sehr schwerlöslich oder schlechtweg unlöslich bezeichnete Substanzen ist auch der Harn nicht. Nimmt man hinzu, dass je

<sup>1)</sup> Dieses Archiv Bd. XXVIII. S. 233.

<sup>2)</sup> Reichert's Archiv 1866. S. 196.

pathologisch Niereninfarcte nicht selten beobachtet werden, so war es immerhin der Mühe werth, den Versuch zu machen, auf experimentellem Wege eine ausgedehnte Verstopfung von Harnkanälchen zu Stande zu bringen. Man muss nur natürlich zu diesem Zwecke möglichst indifferente Substanzen wählen und womöglich solche, die geneigt sind, krystallinische Niederschläge zu geben, da von feinvertheilten und amorphen Niederschlägen zu erwarten steht, dass sie, wenn auch gebildet, einfach fortgespült werden. Dem beabsichtigten Zweck schien sehr gut der schwefelsaure Strontian zu entsprechen, der sich bei gleichzeitiger Anwendung von schwefelsaurem Natron und salpetersaurem Strontian oder Chlorstrontium bilden musste. Ich habe schon vor einigen Jahren Versuche in dieser Richtung angestellt und sie neuerdings um einige weitere vermehrt. Zur Anwendung kamen meistens 10procentige Lösungen der Substanzen in Mengen von 8—10 Grm. Lösung pro Tag bei Kaninchen; es wurden bald beide Substanzen subcutan eingeführt, an verschiedenen Körperstellen, bald beide in den Magen, die eine Vormittag, die andere Abends, bald die eine subcutan, die andere in den Magen und die Einspritzungen mindestens 8 Tage lang gemacht. Der Erfolg entsprach — was die Nieren betrifft — den Erwartungen sehr wenig. In vielen Fällen blieben die Harnkanälchen ganz frei von Niederschlägen, in anderen bildeten sich geringe Mengen und nur in einem Falle war ein erheblicher Theil der Harnkanälchen mit grossen, schon makroskopisch sichtbaren Krystallen verstopft. Interesse bietet noch das Verhalten des Harns. Derselbe enthielt reichlich schwefelsaure Salze und Strontian neben einander. Beim Ansäuern mit Salzsäure wurde er zuerst klar, falls er (wie gewöhnlich bei alkalischer Reaction) trübe entleert war, sehr bald aber — je nach dem Gehalt an Strontian früher oder später — entstand ein feinkörniger mikrokrySTALLINISCHER Niederschlag von schwefelsaurem Strontian. Die Menge desselben betrug in einem Fall, in dem sie bestimmt wurde, 0,102 Grm. in 100 Ccm. Der alkalische Kaninchenharn vermag also schwefelsauren Strontian in Lösung zu halten resp. dessen Ausscheidung zu verhindern. Die Alkalescenz ist übrigens keine nothwendige Bedingung dafür: auch als die Versuche bei Weizenfütterung gemacht wurden, welche die Ausscheidung eines klaren, sauren Harns bedingt, schied sich nach Salzsäurezusatz, schwefelsaurer Strontian ab.

### 3. Ueber eine neue Farbenreaction des Eiweiss.

Beim Behandeln von Eiweisskörpern mit Säuren treten, wie bekannt, Farbstoffe auf, namentlich blaue und rothe<sup>1)</sup>. Sie haben von jeher ein besonderes Interesse erregt, da sich an sie die Hoffnung knüpfen konnte, durch weitere Behandlung daraus vielleicht die Farbstoffe des Thierkörpers selbst zu erhalten. Bisher sind alle diese Versuche gescheitert und ich habe auch nur über einen negativ ausgefallenen Versuch zu berichten, doch scheint mir das Resultat von einigem Interesse und der Mittheilung werth zu sein.

Den Ausgangspunkt bildeten die Färbungen, welche bei Einwirkung von Alkalien auf Eiweiss entstehen und bisher keine Berücksichtigung erfahren haben. Es ist allgemein bekannt, dass bei der Stickstoffbestimmung in Eiweisskörpern durch Glühen mit Natronkalk die vorgeschlagene Salzsäure nicht selten eine rothe oder violette Farbe annimmt. Die Intensität dieser Färbung lässt sich steigern durch eine bei gelinder Temperatur vorgenommene unvollständige Verbrennung, die sich mehr als trockene Destillation mit Natronkalk darstellt. Wenn man Casein, etwa 5—10 Gramm, oder Blutalbumin oder irgend einen anderen Eiweisskörper, mit seinem 4 bis 5fachen Gewicht Natronkalk vermischt gelinde erhitzt, so dass erst gegen das Ende der Operation Glühen stattfindet, so erhält man in der mit etwas Salzsäure beschickten Vorlage eine wässrige Flüssigkeit, reichlich untermischt mit braunrothen öligen Tropfen. Die Färbung nimmt beim Stehen an der Luft an Intensität zu. Dampft man das Gemisch auf dem Wasserbad ein — in der Regel geschah dieses erst, wenn der Kolben 24 Stunden gestanden hatte — und zieht den bleibenden Rückstand mit starkem Alkohol aus, so bleibt der grösste Theil des Salmiak zurück und man erhält jetzt ein intensiv kirschroth oder blauroth gefärbtes Filtrat. Dasselbe wird verdampft, die Extraction mit Alkohol, diesesmal absoluten, nochmals wiederholt und das Filtrat wieder verdampft. Die so erhaltene blaurothe Masse ist mit Leichtigkeit löslich in Alkohol, unvollständig in angesäuertem Wasser, unlöslich in ammoniakhaltigen. Die alkoholische Lösung mit Zinn und Salzsäure auf dem Wasserbad

<sup>1)</sup> Vgl. hierüber Adamkiewicz, Pflüger's Archiv Bd. IX. S. 156 und Zeitschr. f. exp. Pathol. Bd. III. S. 412.

erwärmt, verändert allmählich ihre Farbe und nimmt schliesslich genau denselben Farbenton an, wie eine gleich behandelte Hämatinlösung (Hoppe-Seyler hat bekanntlich vor Kurzem gezeigt, dass bei der Reduction von Hämatin Urobilin entsteht, Ber. d. deutsch. ch. G. Bd. VII. S. 1065). Unterbricht man in diesem Zeitpunkt die Operation und schüttelt die Flüssigkeit mit Chloroform, so färbt sich dieses gelbroth mit grüner Fluorescenz und zeigt auch den Absorptionsstreifen des Urobilin, wiewohl mit verwaschenen Rändern. Die Uebereinstimmung in der Farbe tritt namentlich beim Verdünnen hervor: die gelbe Farbe geht dabei in Rosenroth über. Es gelang nun aber durchaus nicht immer, die Reduction bei dem gewünschten Punkt zu begrenzen: sie ging bald nicht weit genug, bald zu weit d. h. die Flüssigkeit wurde vollständig entfärbt; eine Urobilinlösung zeigt übrigens dasselbe Verhalten, wie schon von Esoff<sup>1)</sup> angegeben ist; ebenso auch Hämatinlösung und es gelingt auch regelmässig, Harn durch andauernde Behandlung mit Zink und Salzsäure vollständig zu entfärben.

Constantere Resultate erhielt ich, wenn ich den erwähnten blauröthen Farbstoff mit Zinkstaub und etwas Wasser verrieb, dann bei gelinder Temperatur destillirte. Es ging hierbei mit den Wasserdämpfen ein farbloses Oel über, das nach eintägigem Stehen an der Luft eine prachtvolle rosenrothe Farbe annahm. Beim Schütteln des Gemisches mit Aether und Verdunsten des ätherischen Auszuges bleibt ein harzartiger gelbrother Rückstand. Derselbe löst sich mit grösster Leichtigkeit in Aether, Chloroform, Alkohol. Die Lösungen sind oft von überraschender Farbeschönheit: intensiv goldgelb mit dem bekannten rosenrothen Schein der Ränder beim Schütteln und grün fluorescirend; beim weiteren Verdünnen werden sie rosenroth. Die alkoholische Lösung zeigt den Absorptionsstreifen des Urobilin, besonders scharf begrenzt, wenn man sie ansäuert, wobei sie gleichzeitig einen mehr rothen Farbenton annimmt. Durch Ammoniakzusatz wird die alkoholische Lösung mehr gelb. Die Fluorescenz verschwindet allmählich in dieser Lösung; setzt man alsdann einige Tropfen Chlorzinklösung hinzu, so tritt sie auf's Neue hervor; allerdings nicht so stark, wie bei einer frisch bereiteten Urobilinlösung. Der Absorptionsstreifen der ammoniakalischen mit Chlorzink versetzten

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv Bd. XII. S. 50.



Lösung reichte ungefähr von 126—137 der Skala, wenn Na auf 100, K $\alpha$  auf 71, K $\beta$  auf 191, Sr $\delta$  auf 148 stand. Die Lösung verändert sich allmählich, doch zeigte eine alkoholische Lösung, die gut verschlossen und vor Licht geschützt ein Jahr lang aufbewahrt war, noch den Absorptionsstreifen, wenn auch etwas verwaschen. Trotz der grossen Aehnlichkeit in den äusseren Erscheinungen kann man die Gegenwart von Urobilin in den Lösungen nicht annehmen. Das Urobilin hat den Charakter einer schwachen Säure und löst sich so leicht in Ammoniak, dass es auch aus einem Gemenge verschiedener Substanzen durch dieses Reagens aufgenommen wird; der erwähnte, beim Verdunsten des ätherischen Auszuges bleibende Rückstand giebt an Ammoniak nichts ab. Dagegen ist wohl an die Möglichkeit zu denken, dass mein Product mit dem von Stockvis<sup>1)</sup> bei der trockenen Destillation des Bilirubin erhaltenen übereinstimmt, das Stockvis freilich für das Chromogen des Urobilin erklärt, aus dem durch Oxydation wahres Urobilin entstehe. So wäre doch ein Zusammenhang zwischen dem Product aus Eiweiss und einem nahen Derivat des Bilirubin hergestellt. Leider befinde ich mich nicht im Besitz einer grösseren Quantität Bilirubin, kann also den Versuch von Stockvis vorläufig nicht wiederholen. Ich bemerke noch, dass der Uebergang des farblosen Oeles in die gefärbte Substanz in der That unter Sauerstoffaufnahme erfolgt. Vielleicht stehen auch die Beobachtungen von Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> über die Producte, die beim Erhitzen des Reductionsproductes des Hämatin mit Zinkstaub entstehen, in einen gewissen Zusammenhang mit meiner Beobachtung.

#### 4. Ueber die Bestimmung des Indigos im Harn.

Zu diesem Zweck ist von Jaffe<sup>3)</sup> vor einigen Jahren eine Methode angegeben worden, welche nur den Nachtheil hat, dass sie etwas umständlich ist. Die Leichtigkeit nun, mit der sich selbst bei indicanarmen Harnen die Ausscheidung des Indigos nach Zusatz von Salzsäure und Chlorkalk vollzieht, ruft immer wieder den Wunsch wach, diese schöne Reaction, die gleichfalls von Jaffe stammt, zu einer directen, wenn auch nur annähernden Bestimmung

<sup>1)</sup> Med. Centralbl. 1873. S. 449.

<sup>2)</sup> Tübinger Unters. S. 436.

<sup>3)</sup> Pflüger's Archiv Bd. III. S. 448.

des Indigos zu verwerthen. Am nächsten liegt es, das Indigoblau mit Aether oder Chloroform auszuschütteln und den Gehalt der Lösung colorimetrisch festzustellen. Allein es gelingt auf diesem Wege selten, die ganze Menge des Indigoblau in den Aether oder das Chloroform überzuführen; namentlich scheidet sich an der Berührungszone der beiden Flüssigkeiten leicht Indigo aus. Ebenso geht bei der directen Filtration sehr leicht Indigo in das Filtrat über falls es sich nicht um eine grössere Menge flockig ausgeschiedenen Indigos handelt. Eine directe Wägung desselben nach dem Sammeln auf dem Filter ist auch kaum zulässig, da er nicht immer hinreichend rein dazu ist. Es gelingt nun mit Leichtigkeit, allen Indigo auf dem Filter zurückzuhalten, wenn man den Harn, sobald man die Reaction mit Salzsäure und Chlorkalk als beendet ansehen kann, mit Aetznatron alkalisch macht. Es entsteht dabei ein Niederschlag von Phosphaten, der das Indigoblau mechanisch mitreisst und so fest hält, dass das Filtrat vollkommen frei von Indigoblau ist, ja dass man den Niederschlag sogar mit heissem Wasser auswaschen kann. Trocknet man das gut ausgewaschene Filter bei gelinder Wärme, zerschneidet es und kocht mit Chloroform aus, so löst sich das Indigoblau vollständig, wenngleich etwas schwierig auf. Ist die Menge des Phosphatniederschlages gross — in der Regel fällt reichliche Phosphatmenge und viel Indican zusammen —, so ist es zweckmässig, den Niederschlag vom Filter abzulösen und in der Achatreibschale zu zerreiben. Die etwa hängen bleibenden Reste werden mit etwas Papier ausgewischt oder die Reibschale mit Chloroform ausgespült. Der Gehalt der Lösung an Indigo kann leicht durch Vergleich mit einer Lösung von bekanntem Gehalt festgestellt werden. Die Lösung des am Phosphat haftenden Niederschlages erfolgt etwas träge; weit leichter geht sie von Statten, wenn man den Phosphatniederschlag auf dem Filter mit sehr verdünnter Säure behandelt, auswäscht und dann, wie vorhin verfährt. Allein es lässt sich kaum vermeiden, dass dabei etwas Indigo in das saure Filtrat übergeht und sich der Bestimmung entzieht. Es ist also wohl zweckmässiger, die Behandlung mit Säure zu unterlassen. Sobald das Papier mit dem daran haftenden Niederschlag weiss erscheint, kann man darauf rechnen, das Indigoblau vollständig im Chloroform zu haben. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man nach erschöpfender Behandlung mit

Chloroform den Kolbeninhalt ausschüttet, das Chloroform abdunsten lässt, mit verdünnter Säure behandelt, auf dem Filter auswäscht, trocknet und nun aufs Neue mit Chloroform digerirt: dasselbe bleibt jetzt farblos, die erste Chloroformbehandlung hatte also kein Indigoblau zurückgelassen.

Zur Herstellung der Vergleichslösung verwendet man feingepulvertes durch Oxydation von Indigoweiss dargestelltes Indigoblau, das vorher wiederholt mit Chloroform ausgekocht ist, um alles Indigoroth zu entfernen, welches bei der Bestimmung störend ist. Man bringt am besten eine kleine Quantität davon in ein Filter, trocknet dasselbe und wägt Indigo und Filter. Auf das Filter giesst man wiederholt heisses Chloroform, trocknet wieder und erfährt durch die Gewichts-differenz die Menge des in Lösung gegangenen Indigoblau, die übrigens stets sehr geringfügig ist. Das Chloroform darf natürlich für sich verdunstet keinen Rückstand lassen. Die Lösung hält sich auch im Dunkeln bei längerer Aufbewahrung, wie es scheint, nicht ganz ohne Verfärbung und muss daher ab und zu frisch bereitet werden. Dennoch ist nicht zweckmässig, weniger als etwa 200 Ccm. Lösung jedesmal zu machen, da sonst die Gewichts-differenz gar zu klein ausfällt. Sehr zweckmässig dient zur Herstellung der Lösung nach dem Jaffe'schen Verfahren dargestellter Harnindigo, der indessen auch vorher von etwas Indigoroth befreit werden muss.

Eine gewisse Schwierigkeit liegt noch in der Bemessung des Chlorkalkzusatzes. Setzt man zu wenig zu, so bleibt vielleicht Indican unzersetzt, während ein Ueberschuss von Chlorkalk wieder zur Zerstörung von Indigo führen kann. Ich habe diese Schwierigkeit durch folgendes Verfahren zu umgehen gesucht, dass nach der Beschreibung vielleicht sehr umständlich erscheint, bei der Ausführung aber durchaus einfach ist.

2 Proben des zu untersuchenden Harns von je 10 Ccm. werden in 2 kleinen Bechergläsern mit je 10 Ccm. Salzsäure (gewöhnliche reine von 1,12 spec. Gew.) gemischt. Die Probe a mit 0,2, b mit 0,4 Ccm. Chlorkalklösung versetzt. Es ist leicht zu entscheiden, welche der beiden Proben nach etwa  $\frac{1}{2}$  Minute stärker gefärbt erscheint; es wird, der Regel nach, die Probe b sein; man setzt zu Probe a alsdann noch 0,4 Ccm. hinzu; und falls nun a stärker gefärbt erscheint zu b 0,4 Ccm. in der Art, dass sich die Proben

bezüglich ihres Chlorkalkgehaltes stets um 0,2 Ccm. unterscheiden. Man gelangt so leicht zu der Grenze, bei welcher die Probe mit grösserer Chlorkalklösung nicht mehr dunkler gefärbt erscheint, sondern in Folge von Zerstörung von Indigo heller. Tritt diese Erscheinung beispielsweise bei einem Zusatz von 1,2 Ccm. ein, so verwirft man diese Probe und behält die mit 1 Ccm. zur Bestimmung. Zur Sicherheit mischt man jetzt nochmals 10 Ccm. Harn, 10 Ccm. Salzsäure und 1 Ccm. Chlorkalklösung. Diese beiden Proben dienen dann zur Bestimmung: sie werden mit Natronlauge nahezu neutralisirt, dann mit kohlensaurem Natron übersättigt, nach einigen Minuten durch ein nicht zu kleines Faltenfilter filtrirt und mit heissem Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction gewaschen, bei gelinder Wärme getrocknet, zerschnitten, und in einem trockenen Kölbchen mit Chloroform ausgekocht, bis dasselbe sich nicht mehr färbt (die Erhitzung kann direct auf dem Drahtnetz geschehen), die Auszüge filtrirt und successiv vereinigt. Bei mässig indicanreichen Harnen reicht man mit etwa 30 Ccm. Chloroform aus; bei stark indicanhaltigen ist weit mehr zur vollständigen Lösung des Indigo nöthig, doch thut man überhaupt besser, in diesem Fall nicht 10 Ccm. Harn zur Bestimmung zu nehmen, sondern nur  $2\frac{1}{2}$  oder 5 und  $7\frac{1}{2}$  resp. 5 Ccm. Wasser vor dem Salzsäurezusatz. Es ist zweckmässig, den Chloroformauszug gleich in einen trockenen Messcylinder zu filtriren und auf eine runde Anzahl Ccm. zu verdünnen. Zum Vergleich der Farbenintensität dienen kleine Glascuvetten<sup>1)</sup>, in die man die Lösungen hineingiesst. Die von mir benutzten bestehen aus einem U-förmigen gebogenen dicken Glasstabe, der auf beiden Seiten genau bis zur Dicke von 1 Cm. plan geschliffen ist. Auf jeder Seite ist eine Spiegelglasplatte aufgekittet. Die Bestimmung gestaltet sich nun etwas verschieden, je nachdem die erhaltene Lösung stärker oder was der häufigere Fall schwächer gefärbt ist, wie die Normallösung. Im letzteren Fall giesst man in die eine Cuvette 10 Ccm. der erhaltenen blaugefärbten Lösung, in die andere 10 Ccm. Chloroform und lässt aus einer Glashahnbürette oder einer feingraduirten Pipette soviel der Normallösung hinzufliessen, bis die Färbung beider

<sup>1)</sup> Dieselben sind von Warmbrunn und Quilitz hier bezogen zum Preise von 2—2,5 Mk. pro Stück. Man braucht 2 Cuvetten für wässrige und 2 für alkoholisch, ätherische etc. Flüssigkeiten.

Flüssigkeiten gleich erscheint. Die Beurtheilung ist am leichtesten bei auffallendem Licht gegen eine weisse Unterlage; zweckmässig stellt man die Glaskästchen auf ein Blatt Papier und drückt an die hintere Seite ein der Form der Platte entsprechendes angefeuchtetes Stück Schreibepapier an, welches leicht haftet. 10 Ccm. Harn geben beispielsweise 30 Ccm. blaufärbtes Chloroform. 10 Ccm. Chloroform bedurften eines Zusatzes von 2,0 Ccm. der Normallösung zur Erreichung gleicher Farbenintensität. Dieselbe enthielt in 200 Ccm. 7,4 Milligr. Indigo, in 2 Ccm. also 0,074 Milligr. Da die Färbung beider Lösungen jetzt gleich ist, so enthalten 12 Ccm. des Chloroformauszuges 0,074 Milligr. also 30 Ccm. d. h. 10 Ccm. Harn  $\frac{0,074 \cdot 30}{12} = 0,185$  Milligr., 100 Ccm. 1,85 Milligr. — Ist der

Chloroformauszug stärker gefärbt, wie die Normallösung, so kann man ihn entweder soweit mit Chloroform verdünnen, bis die Färbung schwächer ist und dann wie gewöhnlich verfahren, oder umgekehrt den Chloroformauszug so lange zu ungefärbtem Chloroform tropfen lassen, bis die Färbung beiderseits gleich erscheint. Die Rechnung ergibt sich von selbst. Der Gehalt eines nach reiner Fleischfütterung entleerten Hundeharns ergab sich so in 2 Versuchen zu 7,6 und 7,06 Milligr. in 100 Ccm. Die Uebereinstimmung ist allerdings keine sehr grosse, das Verfahren kann auch nur beanspruchen, Annäherungswerthe zu geben, ist aber nichtsdestoweniger für manche Zwecke, namentlich für grössere Fütterungsreihen, wo es weniger auf die absoluten, als auf die relativen Werthe ankommt, recht brauchbar. Wenn die Färbung des Chloroforms sehr schwach ist, genügt eine Schicht von 1 Cm. Dicke nicht; in diesem Fall habe ich die Vergleichung in möglichst gleich weiten Cylindern gemacht oder mich damit begnügt, zur Sicherung des Urtheils die Vergleichung erst in der gewöhnlichen Weise zu machen und dann die Apparate um 90° zu drehen und der Quere nach hindurchzusehen: der lichte Abstand der Glasstäbe beträgt nemlich in den beiden hauptsächlich benutzten Cüvetten 30,5 und 31 Mm., so dass eine derartige Benutzung durchaus zulässig erscheint. Viel bequemer wäre, wie für alle diese Zwecke, das Hermann'sche Hämoskop, wenn es gelänge, das Instrument chloroformdicht zu machen, was indessen auf erhebliche Schwierigkeiten stösst.

Ich habe das Verfahren bisher vorzugsweise bei Hundeharn

angewendet, doch stösst man auch bei einigermaassen indicanreichem menschlichen Harn auf keine Schwierigkeit. So gaben 10 Ccm. Harn in einem Fall von Ileus 75 Ccm. intensiv gefärbten Chloroformauszug. Derselbe war erheblich dunkler, wie die Vergleichslösung (3,7 Milligr. in 100 Ccm. — Eine genauere Bestimmung habe ich nicht gemacht, da ich nicht ganz sicher war, dass die Normallösung in ihrer Farbe nichts eingebüsst hatte). Darnach würden 100 Ccm. dieses Harns die enorme Menge von 27,7 Milligr. Indigo enthalten, eine Zahl, die ich fast Anstand nehmen möchte, für richtig zu halten. — Bei sehr indicanarmen menschlichem Harn, der mit Salzsäure und Chlorkalk nur eine Violetfärbung giebt, lässt sich Indigoblau oder Indigoroth auf diesem Wege nicht nachweisen: der Phosphatniederschlag giebt an Chloroform nichts ab. Wenn man nun auch zweifelhaft sein kann, ob die Rothfärbung in der That auf Bildung von Indigoroth beruht, so muss man andererseits doch an die Möglichkeit denken, dass das Verschwinden des Indigoroth der reducirenden Einwirkung des alkalischen Harns zuzuschreiben ist. In der That findet eine solche statt. Jeder Harn reducirt mit Aetznatron versetzt, Indigocarmin in nicht unbeträchtlicher Menge und schon in der Kälte, ja selbst feinvertheiltes Indigoblau, wenn auch nicht so energisch. Macht man ihn mit kohlen-saurem Natron alkalisch, so tritt die Reduction in der Kälte nicht mehr ein (wohl aber in der Wärme — die Zuckerprobe mit Indigolösung ist daher nicht viel werth — man müsste denn auf quantitative Verhältnisse recurriren). — Die weitere practische Verwerthung muss ich denen überlassen, denen klinisches Material zur Verfügung steht. Ich bemerke nur noch, dass man, statt die calorimetrische Methode anzuwenden, auch den Chloroformauszug destilliren und den rückständigen Indigo bestimmen könnte, beispielsweise nach dem volumetrischen Verfahren von Leuchs (Journ. f. pr. Ch. Bd. 105 S. 107).

---