

XXVII.

Ueber das Indigoroth (Indirubin).

Aus der medicin. Abtheilung des Herrn Prof. O. Rosenbach im
Allerheiligen-Hospital zu Breslau.

Von Dr. Heinrich Rosin, Assistenzarzt.

Rothe Farbstoffe normaler und pathologischer Harne sind häufig beobachtet und beschrieben worden. Seit der Entdeckung des „Urrhodin“ durch Heller¹ wurden für solche rothe Farbstoffe die verschiedensten Namen eingeführt. Ein anderer Theil blieb unbenannt und wurde nur als ein „eigenthümlicher“ oder ein „neuer“ Harnfarbstoff bezeichnet.

Die Beschreibung fast aller dieser rothen Harnfarbstoffe leidet aber an einer erheblichen Unvollständigkeit in der Charakteristik, ja bei den meisten ist nicht einmal der Versuch einer Darstellung gemacht worden und man beschränkte sich auf die Angabe einiger Reactionen. Andere sind in zweifellos sehr unreinem Zustande gewonnen, bei den allerwenigsten ist eine Krystallisation erzielt oder der Versuch einer Analyse gemacht worden. Bei dem Mangel einer einigermaassen genauen Individualisirung solcher Farbstoffe war es denn auch möglich, dass nicht zusammengehörige für identisch erklärt, andererseits bekannte nicht wiedererkannt, mit neuen Namen belegt und als neue Farbstoffe beschrieben wurden.

Insbesondere gilt dies von einem rothen Farbstoffe, dessen Charakteristik die Aufgabe dieser Untersuchungen ist, nemlich vom Indigoroth oder Indirubin, jenem rothen Farbstoffe, welcher im Pflanzenreiche als Begleiter des Indigoblau schon lange bekannt ist.

Bereits von mehreren Autoren ist die Vermuthung ausgesprochen worden, dass gewisse Rothfärbungen des Harns, welche übrigens meist an pathologischen Harnen beobachtet wurden, auf die Bildung von Indigoroth oder Indirubin zurückzuführen seien.

So spricht F. Hoppe-Seyler² in seiner Arbeit „über das Indican als constanten Harnbestandtheil“ die Ansicht aus, dass das „Indirubin“ in geringer Menge überall da sich bildet, wo Indigoblau sich findet. Auch Jaffe³ erwähnt gelegentlich der Beschreibung seiner „quantitativen Bestimmung des Harnindicans“, dass durch die von ihm angegebene Methode neben Indigoblau auch Indigoroth (nebst anderen braungefärbten Materien) sich bilde. Besonders aber haben einerseits Nencki⁴ und Niggeler⁵, andererseits Schunk⁶ auf das Vorkommen des rothen Harnfarbstoffs hingewiesen, der nach ihrer Ansicht mit Indigoroth oder Indirubin identisch ist.

Aber diese Ansichten waren nur Vermuthungen, die wenig beachtet wurden, zumal da in der That nicht der Beweis dafür erbracht worden war, dass diese rothen Harnfarbstoffe auch wirklich Indigoroth und identisch seien mit Indigoroth der Pflanzen; und zwar konnte dies aus erklärlichen Gründen nicht geschehen. Denn abgesehen davon, dass die für Indigoroth angesprochenen Harnfarbstoffe keineswegs genau individualisirt oder dargestellt worden waren, war auch das Vergleichsobject, das pflanzliche Indigoroth selbst, noch nicht genügend untersucht worden. Eine Reindarstellung desselben und eine Krystallisation war besonders von Berzelius⁷ zwar versucht, aber nicht mit gutem Erfolge ausgeführt worden. Die von ihm angegebenen Reactionen waren überdies ungenau. Daher konnte denn auch ein beweiskräftiger Vergleich zwischen dem rothen Harnfarbstoff und dem pflanzlichen Indigoroth nicht angestellt werden.

In Folge des Fehlens einer genügenden Charakteristik und Isolirung des pflanzlichen Indigoroths sowohl als des Harnfarbstoffs war ferner auch ein Vergleich mit dem künstlichen von Baeyer⁸ dargestellten Indirubin bei Beiden nicht möglich.

Als nun im vergangenen Jahre mein verehrter Chef, Herr Prof. O. Rosenbach⁹, dem ich auch die Anregung zu nachfolgenden Untersuchungen verdanke, die von ihm entdeckte burgunderfarbene Reaction gewisser pathologischer Harns beschrieb, glaubte ich bei näherer Untersuchung der durch die Reaction entstehenden Farbstoffe den rothen Farbstoffantheil, welcher schon im Reagenzglase auf die von mir angegebene Methode¹⁰

in Aether mit purpurner Farbe gelöst darstellbar ist*), auf Indigoroth zurückführen zu können. Gleichzeitig vermuthete ich auch, dass gewisse Violettfärbungen des Harns bei Anstellung der Jaffe'schen Indicanprobe, welche von anderer Seite (Brieger, Jaffe, Leube und Salkowski, Neubauer und Vogel) auf einen Skatolfarbstoff zurückgeführt worden sind, auf der Bildung von Indigoroth neben Indigoblau beruhen, ferner meinte ich, dass Rothfärbungen des indicanreichen Harns, die durch gewisse andere Reagentien zu erhalten waren, ebenfalls mit Indigoroth identisch seien. Ich vermuthete, dass im Allgemeinen eine Analogie zwischen Thier- und Pflanzenreich in Bezug auf die Bildung des Indigorothes gerade so existire, wie in Bezug auf die Bildung des Indigoblau. Endlich schien es mir, als ob gewisse bereits beschriebene anders benannte, oder gar nicht bezeichnete rothe Harnfarbstoffe nichts Anderes als Indigoroth seien.

Um diese Vermuthungen und Annahmen nun auch wirklich beweisen zu können, hatte ich aber eine doppelte Aufgabe zu erfüllen.

Einerseits konnte ich mich, soweit es den Harnfarbstoff betraf, nicht mit der Angabe einiger Reactionen begnügen, sondern musste denselben vollständig rein, womöglich krystallinisch, darstellen, analysiren und seine charakteristischen Eigenschaften feststellen.

Ich hatte mich aber auch einer zweiten Aufgabe und zwar

*) Es soll hier auf's Nachdrücklichste betont werden, dass die Ausschüttelung mit Aether nur den rothen Antheil der Rosenbach'schen Reaction veranschaulicht und dass daher die Intensität der Rothfärbung des Aethers nur auf die Menge des vorhandenen Indigoroth zu beziehen ist, keineswegs aber zu einem Schluss auf den Grad der bürgerlicherfarbenen Reaction berechtigt, für welche ein Gemenge der verschiedensten, besonders auch brauner Farbstoffe die Ursache ist. Diese Verwechselung hat bei Vielen, die sich mit der klinischen Bedeutung der Reaction beschäftigten, Irrthümer verursacht, indem sie einzig auf die Menge des vorhandenen Indigorothes ihre Aufmerksamkeit lenkten, und ich bedauere, dass mein Vorschlag, den Farbstoff mit Aether auszuschütteln, der sich nur auf die Untersuchung des Indigorothes bezog, auch bei Beurtheilung der Rosenbach'schen Reaction in Anwendung gezogen wurde.

vorher zu unterziehen: Das Vergleichsobject, das pflanzliche Indigoroth ebenfalls rein darzustellen, was bisher noch nicht ermöglicht war, nicht nur um durch Vervollkommenung seiner spärlich angegebenen Reactionen, sondern auch durch Vergleich der beiderseitigen Analysen die vollkommene Identität beider Stoffe festzustellen.

Beides ist nun nach längeren Versuchen in befriedigender Weise gelungen. Als besonders beweiskräftig musste ich es noch erachten, wenn die Analysen und Reactionen des von mir dargestellten Harn- und Pflanzenindigorothes mit dem von Baeyer⁸ künstlich dargestellten übereinstimmten. Auch diese Uebereinstimmung haben die beiderseitigen Analysen ergeben.

Der Zweck dieser Abhandlung ist es nun, die Resultate dieser Untersuchungen genau darzulegen. Ferner sollen aber auch die bisherigen Veröffentlichungen über rothe Pflanzen- und Harnfarbstoffe, soweit dieselben das Indigoroth betreffen, Berücksichtigung finden. Endlich soll, um auch den Vorgang bei der Bildung des Indigorothes und seine Beziehungen zum Indigoblau klarzustellen, eine von mir gefundene Methode, wodurch es gelingt, Indigoblau direct in Indigoroth überzuführen, beschrieben werden.

A. Das Indigoroth der Pflanze.

I. Die bisherige Methode der Darstellung und die Eigenschaften nach Berzelius.

Es ist schon seit langer Zeit bekannt, dass der rohe käufliche Indigo nicht allein Indigoblau enthält, sondern dass in ihm eine Reihe anderer, zu- meist farbiger, doch auch farbloser Substanzen stets als Begleiter des allerdings an Quantität vorwiegenden blauen Farbstoffs vorhanden ist und — neben absichtlichen und unabsichtlichen Verunreinigungen — einen gewissen Bruchtheil jener dunkelblauen Stücke ausmacht, in welchen der Indigo in den Handel kommt. Diese Farbstoffe verdanken ihre Entstehung demselben Vorgange, wie die Hauptsubstanz, das Indigoblau, nemlich einem Gährungs- und Oxydationsprocesse, welchem die Blätter und Stengel der Indigofera-Arten und einiger anderer tropischer Pflanzen mittelst der Gährungs- und Schlagküpe unterworfen werden, um das Indigoblau aus der in ihnen enthaltenen farblosen Muttersubstanz zu gewinnen, welcher Schunk¹⁵ den Namen Pflanzenindican gegeben hat.

Der Erste, welcher über das Vorhandensein eines rothen Farbstoffes im rohen Indigo Einiges erwähnt, ohne ihm dabei den richtigen Namen zu geben, ist Chevreul¹⁶ gewesen. Derselbe beobachtete, dass man, wenn man käuflichen pulverisirten Indigo mit Wasser auskocht (wobei sich Gummi, Extractivstoffe, Salze und eine grüne Substanz lösen), aus dem übrigen Pulver noch gewisse Bestandtheile — etwa 30 pCt. — durch kochenden Alkohol extrahiren kann. Dieser Extract enthält, abgesehen von einer geringen Menge grüner Substanz und etwas Indigoblau einen rothen, beim Eindampfen harzartigen Stoff, welchen Chevreul als rothes Harz bezeichnet. Diese allerdings noch äusserst unreine Substanz konnte nichts Anderes sein, als ein Gemenge von Indigo-roth, Indigoleim und braunen Indigo-farbstoffen.

Weit eingehender aber hat sich Berzelius⁷ mit den Begleitern des Indigoblau im rohen Indigo beschäftigt. Ihm ist es gelungen, dieselben zu trennen und einen leimartigen Körper, den Indigoleim, und zwei neue Farbstoffe, das Indigobraun und Indigo-roth zu isoliren. Den Indigoleim gewann er durch Digeriren der zuvor fein zerriebenen Indigostücke mit verdünnter Salzsäure, Schwefelsäure und Essigsäure, welche ihn lösen; aus dieser Lösung wird er als gelbe, oder gelbbraune, firnissartige Masse nach dem von Berzelius angegebenen, hier nicht näher zu berücksichtigenden Verfahren gefällt.

Das Indigobraun erhielt er dann durch Behandeln des Rückstandes mit starker Kalilauge bei gelinder Wärme.

Nach Extraction des Indigobrauns gewann er hierauf das Indigo-roth durch Auskochen des Rückstandes mit Alkohol von 0,83 spec. Gew. Da dasselbe sehr schwer löslich war, so war ein öfteres Kochen mit neuen Portionen Alkohol nöthig, um es vollkommen auszuziehen. Die Lösungen hatten eine dunkelrothe Farbe; ging diese in Blau über, so war dies ein Beweis, dass das Indigo-roth ausgezogen war und nur noch etwas Indigoblau von dem Alkohol gelöst wurde. Wenn der Alkohol der dunkelrothen Lösung dann partiell abdestillirt wurde, so schied sich ein Theil des Indigo-roth als schwarzbraunes Pulver ab. Die davon abfiltrirte, noch roth gefärbte Flüssigkeit liess beim Verdunsten einen „salzartigen“ Rückstand übrig, welcher nach Berzelius eine Verbindung von Indigo-roth und Indigobraun mit Alkali war. Löste er denselben dann wieder in Wasser und vermischte ihn mit Essigsäure, so wurde Indigo-roth und Indigobraun abgeschieden, letzteres aber blieb zum Theil in der überschüssigen Säure gelöst oder konnte ziemlich vollständig durch Waschen mit Wasser entfernt werden, worauf er das Indigo-roth durch Auflösen in Alkohol reinigte.

So dargestellt bildete das Indigo-roth ein rothbraunes Pulver, oder, nach dem Verdunsten der Alkohollösung zur Trockne eine firnissähnliche Masse.

Es war unlöslich in Wasser, verdünnter Säure und Alkohol.

Von Alkohol und Aether wurde es mit tiefdunkelrother Farbe aufgelöst, jedoch in geringer Menge und von Aether mehr, als von Alkohol.

Mit concentrirter Schwefelsäure bildete es eine dunkelgelbe Lösung, die durch Verdünnen mit Wasser leicht gefällt wurde und Wolle gelbbraun bis roth färbte.

Bei der Sublimation im luftleeren Raume entstanden unter partieller Verkohlung farblose Krystalle neben unverändertem Indigo-roth.

II. Prüfung der Berzelius'schen Untersuchungen.

Die Untersuchungen von Berzelius über die farbigen Nebenproducte des Indigo, insbesondere des Indigo-roths, sind nicht allein die ersten genauen gewesen, sondern sie sind trotz der geraumen Zeit, die seitdem verstrichen ist, auch die einzigen*) geblieben. Es sind daher auch alle seine Angaben in die meisten Lehrbücher und Specialwerke übergegangen**) (wiewohl von mancher Seite, z. B. von Fehling, Lehrbuch der Chemie, bezüglich des Indigobraun und Indigo-roth Zweifel ausgesprochen worden sind, dass es sich um reine Körper handeln könnte). Daher mussten auch für mich die Angaben von Berzelius den Ausgangspunkt der Untersuchungen bilden, insofern ich mir pflanzliches Indigo-roth zum Vergleiche mit dem Harnfarbstoff darstellen wollte.

Zu diesem Zwecke kochte ich genau nach Berzelius' Vorschrift etwa $\frac{1}{4}$ Pfd. Indigo mit verdünnter Salzsäure (10 pCt.) so lange aus, als sich dieselbe noch färbte. Nach vielmaligem Extrahiren wurde die anfangs rothbraune, dann hellbraune Flüssigkeit farblos. Hierauf wurde die Säure mit Wasser aus dem Pulver ausgewaschen und dasselbe mit 20procentiger Kalilauge bei gelinder Wärme digerirt. Die Lauge färbte sich anfangs dunkelchocoladenbraun mit einem grünlichen Schimmer (nach Berzelius durch gelöstes Indigoblau hervorgerufen), dann wurde sie heller gelbbraun. Hierbei zeigten sich nun aber mehrere Uebelstände. Erstens filtrirte die Flüssigkeit, worauf schon Berzelius aufmerksam macht, ganz ausserordentlich langsam, wofür ausser der bedeutenden Alkaleszenz auch der braune Farbstoff

*) Die später zu berücksichtigenden Untersuchungen von Schunk¹⁵ gehen nicht vom rohen Indigo, sondern von dargestelltem Pflanzenindican aus.

**) In Ladenburg's Realencyclopädie Bd. V, Artikel: Indigo-roth, finden sich dagegen nur die Reactionen des Indigo-roth angegeben, welche von Baeyer⁸ in Bezug auf das künstliche Indirubin veröffentlicht worden sind.

selbst verantwortlich gemacht werden musste, der der Flüssigkeit eine fast colloide Beschaffenheit verlieh. Ferner war es aber auf diesem Wege überhaupt nicht möglich, alle braunfärbenden Substanzen völlig zu entfernen. Zwar erlangte die Flüssigkeit nach etwa 30 Extractionen eine helle Nuance, aber diese blieb noch gleichmässig bei vielen weiteren Auszügen bestehen. Es blieb also kein Zweifel darüber, dass es auf diesem Wege nicht gelingen würde, den Indigo von allen braunen Bestandtheilen zu befreien, ja es schien durch die Kalilauge eine Zerstörung des Indigo Roth und eine Verwandlung desselben in eine braune Substanz stattzufinden, denn je länger mit Kalilauge extrahirt wurde, um so weniger intensiv war die spätere Rothfärbung bei der Behandlung mit Alkohol.

Trotzdem ich also wahrnahm, dass die Behandlung des rohen Indigo mit kaustischen Alkalien in der Wärme auf das Indigo Roth selbst einen schädigenden Einfluss ausüben, so verfuhr ich zunächst weiter nach Berzelius' Vorschrift, extrahirte möglichst gründlich mit Kalilauge, bis die Farbe des Filtrates eine hellbraune Nuance angenommen hatte und kochte dann den Rückstand mit starkem Alkohol gründlich und so lange aus, bis derselbe anfang sich blau zu färben.

Die einzelnen dunkelroth gefärbten Alkoholportionen vereinigte ich dann und destillirte dieselben partiell ab. Dabei fiel ein dunkelbraunrothes Pulver aus, welches ich auf dem Filter sammelte.

Nun zeigte es sich aber bald, dass es sich hierbei nicht um eine einheitliche Substanz, um reines Indigo Roth handelte wie Berzelius annahm, sondern um ein Gemenge, in welchem unter Anderem Indigo Roth enthalten war. Das ergab sich, wenn ich das Pulver mit kaltem Alkohol übergoss. Der Alkohol färbte sich nicht roth, sondern braun, erst allmählich mischte sich etwas Roth hinzu, so dass die Färbung rothbraun wurde. Noch deutlicher zeigte sich dies bei dem Zusatz von Chloroform zu dem ausgefallenen Pulver. Hier ging erst brauner Farbstoff über, welcher sich im Chloroform als noch leichter löslich, als in kaltem Alkohol erwies. Erst nachdem alles Braun in Lösung gegangen und das Chloroform mehrmals erneut war, begann sich dasselbe kirschroth, dann purpurn zu färben. Ausser braunen

Bestandtheilen enthielt aber dieses Indigoroth auch Indigoblau*) in nicht unbeträchtlicher Menge, welches bei der Wiederauflösung des Ganzen im heissen Alkohol zum Theil als unlöslicher Rückstand übrig blieb. Unter diesen Umständen war die Annahme unmöglich, dass das nach Berzelius dargestellte Indigoroth ein reiner und einheitlicher Körper sei und dem entsprechend konnten auch die von Berzelius angegebenen Reactionen und Eigenschaften nicht als charakteristisch angesehen und mussten zum Theil auf Rechnung der Verunreinigungen gesetzt werden. Vor Allem waren sie unbrauchbar zur Feststellung der Identität mit dem rothen Harnfarbstoff.

Es musste daher ein anderer Weg eingeschlagen werden, der einmal die Anwendung von kaustischen Alkalien in der Wärme vermied, andererseits vollkommen die braunen Verunreinigungen, sowie das Indigoblau vom Indigoroth trennte, und wo möglich ein krystallinisches Product ergab.

III. Neue Methode der Darstellung.

Schon oben war erwähnt, dass die braunen Verunreinigungen des nach Berzelius dargestellten Indigoroths sich in Chloroform als leicht löslich erwiesen. Damit war die Möglichkeit gegeben, dass das Chloroform in vollständigster Weise braune Bestandtheile entfernen konnte. Andererseits hatte ich beobachtet, dass siedendes Chloroform Indigoroth ziemlich leicht löst, jedenfalls viel leichter, als kochender Alkohol, dessen sich Berzelius bediente.

Ferner ergab sich, dass zur Trennung von Indigoroth und Indigoblau nichts geeigneter war, als der Aether. Während Chloroform schon in der Kälte, Alkohol in der Wärme eine nicht unbedeutende Menge Indigoblau aufnimmt, löst Aether das Indigoblau nur in ganz geringen Spuren, Indigoroth dagegen ziem-

*) Trotz gegentheiliger Behauptungen möchte ich betonen, dass Indigoblau in heissem Alkohol und siedendem Aether löslich ist, wenn es amorph und nicht ganz rein ist. Im krystallisirten Zustande löst es sich nicht in Aether, wohl aber noch in heissem Alkohol. Nach einiger Zeit fällt es aus diesen Lösungen wieder aus und wird bei Wiederholung des Verfahrens immer schwerer löslich. Dasselbe gilt von seinen Lösungen in Chloroform.

lich leicht (wenn auch weniger, als kochender Alkohol und bedeutend weniger, als siedendes Chloroform).

Endlich bemerkte ich, dass, wenn man rohen Indigo, ohne vorherige Behandlung mit Säuren und Alkalien, mit siedendem Chloroform extrahirte, das Chloroform sich nicht braun, sondern roth färbte und dass in dasselbe verhältnissmässig wenig Braun und Blau, dagegen eine bedeutende Menge Roth überging.

Durch die Verbindung dieser Thatsachen ergab sich mir nun ein ziemlich einfaches und weit weniger umständliches Verfahren zur Darstellung des Indigoroth, das trotzdem ein wirklich reines Product und zwar Krystalle lieferte. Dasselbe soll in Folgendem genauer angegeben werden.

Eine Quantität (etwa 200 g) rohen, möglichst gehaltreichen Indigos wird auf's feinste zerrieben und in einen geräumigen Kolben gebracht. Hier wird derselbe (ohne vorherige Behandlung mit Säuren und Alkalien) mit Chloroform im Rückflusskühler längere Zeit (etwa 1 Stunde) ausgekocht, dann das Chloroform abfiltrirt, welches dunkelroth gefärbt ist; falls man alles Indigoroth extrahiren will, wird das Pulver mit immer neuen Mengen Chloroform auf dieselbe Weise behandelt, so lange das letztere sich noch deutlich roth färbt. Geht die Farbe in Violett über, so ist fast alles Indigoroth ausgezogen. Die rothen Chloroformlösungen müssen alsdann vereinigt und abdestillirt werden. Dabei fällt bei genügender Concentration das Indigoroth mit etwas gelöstem Indigoblau als schon krystallinisches Pulver aus und das ursprünglich rothe Chloroform nimmt eine immer braunere Färbung an, weil die braunen Farbstoffe sich leichter und länger in Lösung halten. Ist das Chloroform bei der Destillation schliesslich rein braun geworden, was erst nach Abdestilliren des meisten Chloroforms und Erkalten eintritt, so unterbricht man die Destillation und filtrirt die braune, etwas dickflüssige Lösung vom ausgefallenen Indigoroth ab. Hierauf wäscht man dasselbe auf dem Filter zur Entfernung aller noch anhaftenden, braunen Verunreinigungen mit Chloroform gründlich aus, und zwar so lange, bis das Chloroform purpurn gefärbt abfließt.

Das Indigoroth zeigt sich jetzt als ein grauschwarzes, theilweise schon krystallinisches Pulver mit etwas kupfernem Metallglanz, aber es enthält noch Indigoblau als Verunreinigung. Um

es hiervon zu befreien, wird es wiederum in einen grossen Kolben gebracht und in Aether aufgelöst. Nur das Indigoroth geht in Aether über, Indigoblau dagegen nur in nicht nennenswerthen Spuren. (Uebrigens lösen sich im Aether auch Spuren etwaiger, noch nicht ganz entfernter brauner Verunreinigungen.) Der Aether färbt sich schön purpurroth. Erscheint die Farbe der zur Lösung verwendeten Aetherportionen gesättigt, so wird abfiltrirt und mit neuem Aether ausgezogen, so lange sich derselbe noch roth färbt. Ist sodann alles Indigoroth gelöst, so werden die vereinigten Aethermengen in einem geräumigen Kolben auf dem Wasserbade abdestillirt, und zwar so lange, bis die Flüssigkeit fast undurchsichtig dunkelroth erscheint und sich zu trüben beginnt. Jetzt unterbricht man die Destillation und stellt die ätherische Lösung kalt behufs Krystallisation. Nach einiger Zeit fallen aus derselben nadelförmige Krystalle in reichlicher Menge aus, zum Theil in Sternform gruppirt. Sie fallen besonders gross und schön aus, wenn man die ätherische Lösung nicht zu weit abdestillirt und erreichen dann oft Centimeterlänge, daneben finden sich auch rhombische Plättchen.

Die Mutterlauge ist gewöhnlich noch schön purpurn gefärbt und lässt durch weitere Concentration noch weitere Krystalle ausfallen. Falls die Concentration nicht zu weit getrieben wird, bleiben etwaige mitgelöste Spuren von Indigoblau und braune Bestandtheile in der Mutterlauge. Die Krystalle sind, auf diese Weise dargestellt, bereits nach einmaligem Umkrystallisiren aus Aether analysenrein und können alsbald der Analyse unterworfen werden.

IV. Analyse.

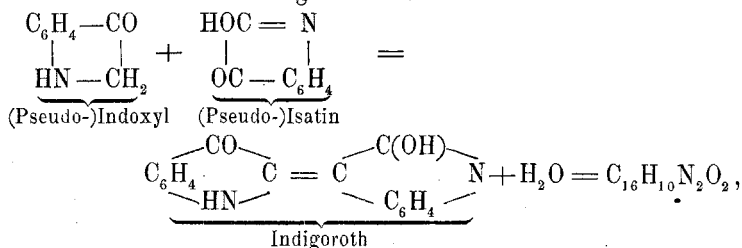
Wie schon erwähnt, ist es Baeyer auf künstlichem Wege, durch Vereinigung von Indoxyl und Isatin gelungen, einen krystallinischen rothen Farbstoff herzustellen, den er für Indigoroth hielt, denselben dann zu analysiren und hiernach eine Constitutionsformel aufzustellen. Es schien mir daher bei der Analyse des von mir gewonnenen Pflanzenindigoroths als das Richtige, von der von ihm aufgestellten Formel auszugehen in der Erwartung der Uebereinstimmung des von ihm künstlich erhaltenen Farbstoffs mit dem von mir gewonnenen natürlichen; an-

derenfalls hätte ich zur Aufstellung einer neuen Formel schreiben müssen und der Farbstoff Baeyer's wäre nicht mit dem pflanzlichen Indigoroth identisch gewesen.

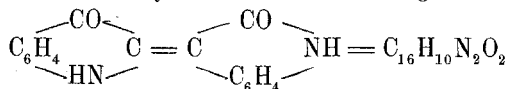
Baeyer's Analyse hätte ergeben:

	Gefunden.	Berechnet.
C	37,2	37,3 pCt.
H	3,7	3,8 -
N	10,5	10,7 -

und führte zur Aufstellung der Formel:



also zu einem dem Indigoblau völlig isomeren Körper, da letzterem nach Baeyer und v. Sommaruga die Formel



zukommt.

Nach Baeyer ist das Indirubin als Indogenid des Isatins aufzufassen, insofern als Indogenide alle Körper bezeichnet werden, die den zweiwerthigen (pseudo-) Indoxylrest $\text{C}_6\text{H}_4\text{—CO—HN—C}$, das Indogen, enthalten, und welche sich in der Weise von carbonylhaltigen Körpern, wie Aldehyden, Ketonen u. s. w. ableiten, dass das Indogen den Sauerstoff der CO-Gruppe dieser Körper ersetzt. Dem Indirubin kommt demnach die Bezeichnung Indogenid des Isatins zu, das Isatin verhält sich dabei, wie ein Aldehyd.

Es ergab nun die Analyse der von mir aus dem Pflanzenindigo dargestellten Substanz, welche mit hülffreicher Unterstützung des Herrn Dr. Schufftan im Universitäts-Laboratorium des Herrn Geheimrath Ladenburg ausgeführt wurde, folgende Resultate:

a) 0,1282 g Substanz ergaben 0,3420 g CO_2 und 0,049 g H_2O .

b) 0,1203 g Substanz ergaben 0,1132 g N entspr. 11,5 ccm N bei 752,3 mm Barometerstand und 18° Celsius.

	Gefunden.	Berechnet.
C	72,85	73,28 pCt.
H	4,25	3,82 -
N	— 10,77	10,68 -

Die Analyse ergab also eine vollständige Uebereinstimmung des aus der Pflanze dargestellten, natürlichen Indigoroths mit dem künstlichen.

V. Eigenschaften und Reactionen des Indigoroth.

1. Lösungsverhältnisse.

Unlöslich ist das Indigoroth in kaltem und heissem Wasser, in verdünnten Mineralsäuren (Salzsäure, Schwefelsäure), Alkalien, ferner in Benzin, Ligroin, Petroläther.

Löslich ist Indigoroth am besten in heissem Chloroform und Eisessig mit schöner Purpurfarbe. In dünner Schicht oder in verdünnter Lösung ist dieselbe carmoisinroth. Schon sehr geringe Mengen Indigoroth besitzen eine intensive Färbekraft. Löslich ist Indigoroth ferner in Schwefeläther, Essigäther, Alkohol, Amylalkohol, Methylalkohol, Benzol, Nitrobenzol, Aceton, Paraffin, ätherischen Oelen, namentlich beim Erwärmen (Ol. citr., Ol. junip., Ol. bergam., Ol. thereb.), heissen fetten Oelen (Ol. oliv., Ol. amygd., Ol. ricini), Anilin, Phenol, Chloralhydrat u. a.

2. Krystallisation.

Reines Indigoroth bildet nadelförmige, wohlgebildete Krystalle oder rhombische Blättchen von dunkelrothbrauner bis schwarzrother, bei durchscheinendem Lichte granatrother Farbe und schön kupfernem Metallglanze. Die Krystalle liegen oft sternförmig zusammen. Indigoroth krystallisirt sehr leicht aus allen seinen Lösungen bei langsamem Verdunsten oder Abdestilliren, oder durch Versetzen der Lösung mit einer Substanz, in welcher sich Indigoroth nicht löst. So krystallisirt es leicht aus der concentrirten alkoholischen Lösung durch genügendes Verdünnen mit Wasser, oder fällt in Krystallen aus, wenn man etwas verdünnte alkoholische Lösung heiss damit gesättigt hat und dann erkalten lässt, ebenso, wenn man eine concentrirte Eisessiglösung hinreichend mit Wasser verdünnt, oder, wenn man eine concentrirte Chloroformlösung mit etwa dem doppelten Volumen Ligroin versetzt.

In amorphem Zustande (wenn man seine Lösung sehr rasch abdampft) ist es kirschroth gefärbt und zeigt dabei nur wenig Metallglanz.

3. Concentrirte, reine Salzsäure greift Indigoroth weder in der Kälte noch in der Wärme an.

4. Concentrirte Schwefelsäure löst das Indigoroth mit anfangs grauer, dann violetter Farbe auf. Hierbei bildet sich eine neue Verbindung, die Indigoroth-Sulfosäure (analog dem Verhalten des Indigoblau). Dieselbe ist in Wasser und Alkohol leicht löslich und ertheilt denselben eine schöne, violettrothe Farbe. Sie ist unlöslich in Aether und Chloroform und

reagirt stark sauer. Mit Alkalien neutralisirt bildet sie das entsprechende Kalisalz, welches in Wasser und Alkohol löslich, in Aether und Chloroform aber nicht löslich, leicht zersetzbar ist und schon durch einen Ueberschuss an Kalilauge angegriffen wird. Die Sulfosäure verhält sich in mancher Beziehung dem Indigoroth selbst ähnlich, insbesondere besitzt sie gleiche spectroscopische Eigenschaften. Mit Wolle und Seide digerirt färbt sie dieselbe schön violettroth und ächt.

5. Oxydation.

Behandelt man Indigoroth mit Oxydationsmitteln, z. B. Salpetersäure, Königswasser, Chlorkalk, so bildet sich Isatin. Verdünnte Salpetersäure oxydirt eine Indigorothlösung sehr langsam in der Kälte, rascher in der Hitze zu Isatin. Das Isatin wurde auf folgende Weise nachgewiesen: Gepulvertes Indigoroth wurde mit Salpetersäure gekocht, bis die Flüssigkeit sich goldgelb gefärbt hatte, dann filtrirt, mit kohlensaurem Natron neutralisirt und mit heissem Alkohol extrahirt. Von dem nach Abdampfen des Alkohols zurückbleibenden, natürlich mit Salzen verunreinigten Isatin brachte ich eine geringe Menge in ein trockenes Reagenzglas und stellte die für Isatin charakteristische Reaction an. Sie besteht darin, dass man die auf Isatin zu prüfende Substanz in concentrirter Schwefelsäure löst und mit etwas Thiophen oder thiophenhaltigem Benzol einigemal kräftig schüttelt. Es entsteht das Indophenin, ein dunkelblauer Farbstoff, der, in concentrirter Schwefelsäure löslich, bei Anwesenheit schon sehr geringer Mengen Isatin dieselbe schön blau färbt.

6. Reduction.

Unterwirft man das Indigoroth einer schwachen Reduction in alkalischer Lösung, z. B. mit Traubenzucker, so bildet sich ein farbloser Körper, welcher bei Berührung mit dem Sauerstoff der Luft oder durch Ansäuern sofort wieder in Indigoroth sich zurückverwandelt. Indigoroth giebt also eine Küpe, der farblose Körper hat schon von Baeyer⁶ und Forrer¹⁷ die Bezeichnung Indirubinweiss erhalten (analog dem auf gleiche Weise aus Indigoblau dargestellten Indigoblauweiss). Die Küpenbildung ist charakteristisch für das Indigoroth und kann neben anderen Reactionen als Erkennungs- und Unterscheidungsmittel von anderen rothen Farbstoffen dienen. Man kann die Küpenreaction im Reagenzglase folgendermaassen anstellen. Eine alkoholische Indigorothlösung wird mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht, mit etwas Traubenzucker versetzt und gelinde erwärmt. Die purpurne Farbe verschwindet dabei, kommt aber sofort wieder, wenn man die Flüssigkeit im Reagenzglase mit Luft schüttelt; hierauf verschwindet die Farbe wieder und kann auf dieselbe Weise wieder hervorgerufen werden. Das Farbenspiel lässt sich oftmals hintereinander wiederholen. Bei stärkerer Reduction in saurer Lösung mit Zinkstaub giebt das Indigoroth keine Küpe mehr, sondern geht in einen farblosen Körper über, der nach den Untersuchungen von Forrer¹⁷ mit künstlich dargestelltem Indirubin Indileucin ist.

7. Durch kochende kaustische Alkalien (Kalilauge, Natronlauge

auch in verdünnter Lösung) wird das Indigoroth allmählich zerstört; es bildet sich ein hellbraunes Zersetzungsproduct. Dieser Umstand macht jede Darstellungsmethode des Indigoroth, bei der kautistische Alkalien verwendet werden, unbrauchbar.

8. Beim Erhitzen schmilzt das Indigoroth nicht, sondern sublimirt, analog dem Indigoblau und mit gleichgefärbten violettrothen Dämpfen. Die Temperatur des Beginns der Sublimation liegt zwischen 295 und 310° C.; bei 340° ist sie eine vollkommene. Es sublimirt in feinen Nadeln, zersetzt sich aber dabei theilweise unter Bildung von braunen Farbstoffen und unter Verbreitung des charakteristischen Indigogeruches.

9. Spectroskopisches Verhalten.

Alle Lösungen des Indigoroth, wie auch seine Sulfosäure, haben ein ganz charakteristisches Absorptionsspectrum im Grün, welches demjenigen des Fuchsin ähnelt (Untersuchung mit Sonnenlicht).

In sehr verdünnter ätherischer Lösung, erhalten durch vierfaches Verdünnen einer concentrirten Lösung (welche schon an und für sich sehr dünn ist), beginnt das Absorptionsband im Gelbgrün zwischen D und E, dicht hinter D und zwar bei D12E, erreicht bei D18E seine stärkste Intensität und behält dieselbe bei bis in's Blaugrüne, bis E65F, also schon hinter b. Dabei ist die Absorption nicht eine völlige. Von E65F an nimmt die Absorption wieder ab und erreicht bei F ihr Ende. Ausserdem zeigt das ganze übrige violette Ende des Spectrums eine ganz leichte Verdunkelung.

Etwas anders verhält sich eine mehr concentrirte, aber noch carmoisinroth gefärbte, ätherische Lösung, erhalten durch Verdünnung einer gesättigten mit gleichen Theilen Aether. Das Band ist hier viel schärfer begrenzt und beginnt bei D gleich mit dem Maximum der Intensität und reicht bis zum Blau, bis F23G, wo es mit ziemlich scharfer Grenze endet; ausserdem wird der Rest des violetten Spectrums etwas verdunkelt.

Eine ganz concentrirte ätherische Lösung beginnt gleichfalls scharf bei D und reicht bis zum Indigo bis F23G, das violette Ende wird ausserdem erheblich verdunkelt.

Es sei schliesslich bemerkt, dass die Eigenschaften des künstlichen Indigorothes, so weit sie von Baeyer angegeben sind, mit den angeführten völlig übereinstimmen.

VI. Beziehungen des reinen Indigorothes aus dem rohen Indigo zu dem aus dem Pflanzenindican dargestellten.

Während Berzelius das pflanzliche Indigoroth aus dem rohen Indigo darstellte und untersuchte, hat Schunk¹⁵ dasselbe auf einem anderen Wege gewonnen und beschrieben. Auch seine Untersuchungen sind nicht wieder von anderer Seite aufgenommen worden. Es ist kein Zweifel, dass sein übrigens ebenfalls nicht vollkommen gereinigtes Product mit dem soeben beschrie-

benen identisch ist, trotz mancher Abweichungen in den Reactionen und es ist daher nöthig, hier des Vergleiches halber näher darauf einzugehen.

Schunk gewann das Indigoroth aus dem Pflanzenindican, der in den Pflanzen vorgebildeten Muttersubstanz der Indigofarbstoffe. Diese letztere Substanz extrahirte er, indem er die getrockneten Stengel und Blätter der Waidpflanze mit Alkohol digerirte und aus dem alkoholischen Auszuge das Indican als hellbraunen Syrup von glykosidartigem Charakter isolirte. Hierauf versetzte er denselben mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure, wodurch ein gefärbter Niederschlag entstand, der in Wasser unlöslich war. Aus demselben trennte er dann 6 farbige Zersetzungsproducte des Indicans, und zwar 4 braune, Indifulvin, Indihumin, Indiretin und Indifuscin; einen rothen, das Indirubin oder Indigoroth und das Indigoblau. Das Indigoroth wurde dabei auf eine sehr umständliche Weise gewonnen, und zwar musste die Darstellungsmethode eine so complicirte sein, weil sie die vorherige Isolirung der braunen Farbstoffe und des Indigoblaus bezweckte. Sie soll daher hier nicht genauer beschrieben werden. Es soll nur bemerkt werden, dass auch Schunk dabei kaustische Alkalien in der Hitze anwendete, welche entschieden einen Verlust und eine theilweise Zersetzung des Indigoroths anstatt eines reinen Productes herbeiführen mussten.

Die von Schunk angegebenen Eigenschaften des Farbstoffes sind mangelhaft, er ist aber dennoch auch selbst von dessen Identität mit dem von Berzelius beschriebenen überzeugt. Diese Eigenschaften sind folgende.

1. Das Indigoroth bildet eine braune, amorphe Masse. Einmal gelang es sogar, aus sehr reinem Indican lange, roth durchscheinende, purpurne bis chokoladenfarbene, seidenglänzende Nadeln, die beim Reiben Bronzeglanz annahmen, darzustellen.

2. Es ist in Alkohol mit purpurner Farbe löslich und durchaus nicht mit Bleizucker und Ammoniak fällbar.

3. Es giebt mit Natronlauge und Zinnoxidul eine Küpe.

4. In concentrirter Schwefelsäure löst es sich mit purpurner Farbe, die beim Verdünnen und Neutralisiren der Flüssigkeit in Lösung bleibt. Ueberschüssiges Natron oder Ammoniak zerstört die Farbe.

5. Es entwickelt beim Erhitzen bromfarbene Dämpfe, die sich zu granatrothen Nadeln von Indirubin verdichten.

6. Es schmilzt und verbrennt mit gelber, russender Flamme.

Vergleicht man diese Eigenschaften mit den für das reine Indigoroth angegebenen, so findet man grösstentheils Uebereinstimmung. Aber in einigen wesentlichen Punkten sind Unterschiede zu constatiren, insbesondere in der Schmelzbarkeit und in der Farbe der braunen Sublimationsdämpfe. Dennoch möchte ich die Identität mit dem Indigoroth nicht bezweifeln. Es ist vielmehr wahrscheinlich, zumal da Schunk sicher nicht jene nur einmal erhaltenen Krystalle, sondern die braune, amorphe Masse zur Feststellung der Reactionen verwendet hat, dass es sich um eine unreine, mit braunen Bestandtheilen vermengte Substanz gehandelt hat. Die braunen Indigofarbstoffe haben aber die Eigenschaft, zu schmelzen und zu verbrennen, wovon ich mich überzeugen konnte, auch sind die Sublimationsdämpfe rein braun; in Verbindung mit Indigorothdämpfen sehen sie rothbraun aus und das Letztere kann sich dann, vom Braun getrennt, krystallisirt absetzen.

Wünschenswerth wäre es allerdings, aus den Zersetzungsproducten des nach Schunk dargestellten Indicans das Indigoroth auf die oben angegebene, dasselbe vollständig rein darstellende Methode zu isoliren und seine Reactionen noch einmal zu prüfen.

B. Das Indigoroth des Harns.

I. Vorkommen.

Das Indigoroth gehört zu denjenigen aus dem Harn darstellbaren Farbstoffen, welche in einem der farblosen Harnbestandtheile ihr Chromogen besitzen, und hat also keine Beziehung zu den farbigen Substanzen desselben. [Daher ist es auch bei der Darstellung des Indigoroth empfehlenswerth, den Harn vorher möglichst zu entfärben, und zwar mit solchen Mitteln, welche das Chromogen nicht mit zur Ausfällung bringen (siehe unten), wie dies für die Darstellung des Indigoblau schon F. Müller¹⁸ und Senator¹⁹ gerathen haben.]

Zahlreiche Umstände beweisen es, dass das Indigoroth seine Herkunft den gleichen Muttersubstanzen ver-

dankt, wie das Indigoblau, als deren Spaltungs- und Oxydationsproducte sie beide gemeinsam aufzufassen sind. Als solche müssen die Indoxylverbindungen des Harns betrachtet werden, das heisst vor allen das indoxylschwefelsaure Kali (Baumann, Brieger und Tiemann²⁰), die Indoxylglycuronsäure (Schmiedeberg²¹ und G. Hoppe-Seyler²²) und vielleicht noch andere unbekannte Verbindungen des Indoxyls*).

In grösserer Menge lässt sich das Indigoroth aus pathologischen Harnen gewinnen, es sind dies in erster Reihe diejenigen Harne, welche die burgunderfarbene Rosenbach'sche⁹ Reaction geben und welche von Letzterem genauer classificirt worden sind. (Natürlich wird die Farbe der Reaction selbst nicht allein vom Indigoroth hervorgerufen, wie dies öfters schon betont worden ist.) Es ist also das Indigoroth in grösserer Menge darstellbar aus dem Harn solcher Individuen, die an schweren Darmerkrankungen leiden, in ganz besonderer Menge bei Ileus und Bruch-Incarcerationen, gewissen Formen schwerer Diarrhöen, ferner bei Kranken, die an schweren Ernährungsstörungen leiden, wie z. B. bei manchen Formen der Phthise, der Krebskachexie, und bei vielen Kranken *sub finem vitae*, also in allen den pathologischen Harnen, bei welchen Prof. Rosenbach das Auftreten seiner Reaction beschrieben hat.

Indigoroth findet sich aber auch, und oft in nicht geringen Mengen, in Harnen, welche die volle Burgunderfarbe bei der Rosenbach'schen Reaction mit ihren charakteristischen Eigenschaften nicht zeigen, sei es, dass die braunen Antheile der Reaction zurücktreten, sei es, dass es gar nicht zu einer Rothfärbung mit blauviolettem Schüttelschaume kommt. Es sind dies auch nicht normale Harne, sie stammen aber von Patienten, die an den verschiedenartigsten Krankheiten leiden, ohne dass dieselben einer einheitlichen Erkrankungsmodalität untergeordnet werden können**).

*) Ewald, welcher die burgunderfarbene Reaction Rosenbach's genauer untersuchte, hat dies seinerseits durch interessante Versuche bestätigt, welche die Farbstoffe dieser Reaction, jedenfalls den rothen, als Indol-derivate charakterisiren.

**) Da sich auch bei diesen Harnen die Aetherausschüttelung in Folge vorhandenen Indigoroths schön roth färbt, so haben diese Harne Ver-

Aber auch aus normalen Harnen lässt sich, wenn auch nur in sehr geringen Mengen, Indigoroth gewinnen, wie sich denn fast jedes pathologisch vermehrte Stoffwechselproduct in Spuren auch bei Gesunden nachweisen lässt*).

Endlich sei hervorgehoben, dass das Indigoroth aus gewissen indicanreichen Thierharnen in bedeutender Menge gewonnen werden kann. Insbesondere ergiebt der Pferdeharn eine sehr grosse Menge Indigoroth, wie nur die schwersten Fälle von Ileus beim Menschen. Auch der Ochsenharn ist ziemlich reich daran. (Bei Darstellung desselben tritt auch ein damit nicht zu verwechselnder Farbstoff auf, der in seinen Eigenschaften mit dem Urorosein übereinstimmt.) In einigen Hundeharnen, die ich untersuchte, konnte ich dagegen nur sehr geringe Mengen von Indigoroth gewinnen (ebenso wenig auch Indigoblau; der Hundeharn scheint also nicht immer reich an Indoxyl-Verbindungen zu sein). Der Kaninchenharn erwies sich frei von Indigoroth (und Indigoblau).

Alle diese indigorothreichen Harne zeigten, wenn man sie mit der Jaffe'schen Probe auf Indigoblau untersuchte, fast immer auch reichliche Mengen desselben. In einzelnen Fällen aber blieb die Menge des letzteren bei weitem hinter derjenigen des darstellbaren Indigoroth zurück. Diese auffällige Thatsache beweist, dass es nicht immer gelingt, die Menge der indigobildenden Substanz des Harns durch die Jaffe'sche Probe vollkommen kenntlich zu machen, und dass die Reactionen, welche Indigoroth erzeugen, zuweilen dies besser im Stande sind.

II. Methode der Darstellung.

Wie die Salpetersäure in der Wärme nach Rosenbach das geeignetste Mittel ist, um die burgunderfarbene Reaction hervorzurufen, so ist sie auch das Reagens, welches am ergiebigsten und einfachsten die Darstellung des Indigoroth aus den hierzu geeigneten, eben beschriebenen Harnen bewirkt, und sie ist auch zuweilen im Stande Indigoroth noch da zu erzeugen, wo die Darstellung von Indigoblau (nach Jaffe) fast oder ganz

anlassung zu Verwechselungen gegeben mit solchen, welche burgunderfarbene Reaction wirklich geben.

*) Man kann dies leicht veranschaulichen, wenn man mehrere (etwa 6) Liter normalen, einigermaassen gesättigten Harns bis etwa $\frac{1}{2}$ Liter eindampft und dann die Untersuchung auf Indigoroth unternimmt. Dieselbe fällt dann immer positiv aus, doch ist die Quantität eine sehr geringe.

negativ ausfällt und wo das Vorhandensein von Indoxylverbindungen durch die letztere Methode nicht angezeigt wird.

Indessen lässt sich das Indigoroth auch auf anderen Wegen erzeugen. Es gelingt dies vor Allem durch die Jaffe'sche Probe, wenn man sie in der Wärme ausführt. Versetzt man nemlich solche Urine mit viel Salzsäure und einigen Tropfen Chlorkalklösung (übrigens auch verdünntem Bromwasser, Liq. ferri u. a. Oxydationsmitteln) und erwärmt dann sofort bis beinahe zum Sieden, so nimmt ein solcher Harn, nicht wie in der Kälte, einen grünlichblauen oder violettblauen Farbenton an, sondern er wird dunkelpurpurroth und enthält jetzt reichliche Mengen Indigoroth.

Ferner entsteht Indigoroth, wenn man zu dem betreffenden Harn viel Salzsäure (gleiche Theile oder wenigstens 5 pCt. davon) hinzusetzt und erwärmt. Die Ausbeute ist hier eine weniger ergiebige*).

Geringere Mengen von Indigoroth bilden sich ferner immer bei Anstellung der Jaffe'schen Reaction auch in der Kälte. Oft wird das Vorhandensein des Indigoroths durch das Indigoblau verdeckt, auch wenn man nach Stockvis und Senator¹⁹ den Harn mit Chloroform ausschüttelt. In manchen Fällen ist aber doch so viel Indigoroth daneben gebildet, dass das Chloroform nicht eine blaue, sondern violette, selbst rothviolette Farbe annimmt. Diese Beimischung des Indigoroth tritt jedoch erst dann, selbst bei scheinbar rein blau gefärbter Chloroformausschüttelung auch im Reagenzglase deutlich hervor, wenn man den mit der Jaffe'schen Probe behandelten und mit Chloroform ausgeschüttelten Harn mehrere Tage lang stehen lässt, am besten, nachdem man den Harn von der Chloroformlösung abgegossen und diese selbst durch Schütteln mit Wasser, welches etwas kohlensaures Natron enthält, im Reagenzglase gewaschen hat; allmählich fällt das Indigoblau aus der Chloroformlösung wieder aus und sammelt sich über derselben. Diese selbst zeigt aber nun eine schön rosaroth Färbung, herrührend vom Indigoroth, welches nach der Entfernung des Indigoblau und anderer, namentlich brauner Verunreinigungen, welche zum grössten Theil in das kohlensaure Natron übergegangen sind, fast isolirt zurückbleibt**).

Auch auf andere Weise kann die Bildung von Indigoroth bei der Jaffe'schen Probe deutlich gemacht werden. Schüttelt man nach Anstellung derselben den Harn nicht mit Chloroform, sondern mit Aether aus, so zeigt sich derselbe oft violett, zuweilen roth, sehr selten rein blau gefärbt, und lässt man den Aether nicht über der Flüssigkeit stehen, sondern giesst ihn ab, wäscht ihn mit kohlensaurem Natron und lässt ihn 24 Stunden gut

*) Gelegentlich der Beschreibung der burgunderrothen Reaction weist Rosenbach auch darauf hin, dass „mit Salzsäure eine leidliche Farbenveränderung, bei der es aber nicht zur eigentlichen tiefbraunrothen Färbung kommt, sich ausführen lässt“. (B. K. W. 1889. No. 1.)

**) Diese rosaroth Färbung hält sich dauernd, wenn kein Ueberschuss an Chlorkalk vorhanden war, anderenfalls blasst sie ab und es lässt sich dann in der Chloroformlösung Isatin nachweisen.

verkorkt stehen, so fällt alles gelöste, bezw. suspendirte Indigoblau wieder aus, der Aether enthält jetzt fast nur Indigoroth und ist von carmoisinrother Farbe^{*)}.

Manchmal lässt sich eine Rothfärbung des Harns bei der Jaffe'schen Probe allerdings nicht auf Indigoroth zurückführen, sondern auf einen anderen Farbstoff, der nicht in Aether übergeht, nemlich auf Urorosein (nicht aber Skatoxyloth). Diese Frage wird weiter unten erörtert werden.

Endlich bildet sich auch eine geringe Menge von Indigoroth neben Indigoblau, wenn man indicanreiche Harne mit Salzsäure versetzt und in der Kälte mehrere Stunden stehen lässt.

Schliesslich muss aber noch eine andere Entstehungsweise des Indigo-rothes neben und mit Indigoblau hervorgehoben werden. In einem Falle von schwerer Cystopyelitis, die zu einem lethalen Exitus führte, beobachtete ich im faulenden indicanreichen Harn ein violettes Sediment, welches sich nach einigem Stehen des Harns an der Luft gebildet hatte. Eine nähere Untersuchung ergab, dass die Farbe desselben bedingt war durch Indigoblau und Indigoroth, welche beide ich getrennt aus dem abfiltrirten und mit heissem Wasser, verdünnter Salzsäure und kohlensaurem Natron gewaschenen Sediment darstellen konnte. Es deckt sich diese Beobachtung mit mehreren später noch zu berücksichtigenden und beweist, dass durch den Einfluss der Fäulniss und der Bakterien eine eben solche Beeinflussung der Indoxylverbindungen statthaben kann, wie durch die bisher erwähnten Reagentien.

Fasst man diese Entstehungsweisen des Indigoroths zusammen, so zeigt sich bei allen das Gemeinsame, dass sie in einer Zersetzung und Oxydation der Indoxylverbindungen bestehen, welche bald mittelst Säuren und Oxydationsmitteln erzielt wird, bald spontan durch Gährung und Fäulniss auf ähnlichem Wege, wie in der Pflanze, erfolgt. Stets, und das sei noch hervorgehoben, entsteht neben Indigoroth auch Indigoblau und zwar in wechselnder Menge so zwar, dass bei Anwendung von Wärme mehr Indigoroth, bei Anwendung von Kälte mehr Indigoblau gewonnen wird.

Bei dem Versuche, Indigoroth in grösserer Menge behufs eingehender Untersuchung aus dem Harn gewinnen zu können, zeigte sich unter den genannten Methoden der Darstellung diejenige mittelst Salpetersäure, wie erwähnt, als die geeignetste. Ich verwendete hierzu Harn, welcher besonders reich an Indoxylverbindungen war, also besonders Harn von an Pleus und Bruchincarcerationen Erkrankten, soweit er mir zu Gebote stand. Nachdem ich aber gefunden hatte, dass der Pferdeharn eine ganz besonders ausgiebige Quelle zur Darstellung bildet, so benutzte ich, da er leichter und in

*) Auch Ortweiler²³ erwähnt diese Thatsache, dass nemlich bei der Aetherausschüttelung der Jaffe'schen Probe der Aether durch einen noch unbekannten Farbstoff roth wird, in seinen Untersuchungen über die Bedeutung des Harnindicans.

grösseren Mengen zu beschaffen war, zugleich auch solchen. Die Darstellung geschieht dann auf folgende Weise:

Etwa 300 Liter von geeignetem Harn werden portionsweise (à 5 Ltr.) mit basisch-essigsaurem Blei vollständig ausgefällt und filtrirt. Das klare, blassgelbe Filtrat wird mit HCl wieder vollständig ausgefällt. Der entstandene Niederschlag von krystallinischem Bleichlorid wird abfiltrirt und die nunmehr salzsäurereiche, hellbraune, bisweilen blasser gefärbte Flüssigkeit mit reiner Salpetersäure versetzt. Dieselbe wird darin gut vertheilt und zwar so, dass auf 1 Liter Flüssigkeit etwa 20 g Salpetersäure kommen. Hierauf wird der so behandelte Harn sofort in grossen Kolben bis nahe zum Sieden erhitzt. Während dieses Vorganges bildete sich das Indigoroth. Es färbte sich der ursprünglich hellbraune Harn erst dunkler, dann violett, dann dunkelkirschroth, wobei die Intensität dieser Färbung die Flüssigkeit fast undurchsichtig macht. Ein weiteres Sieden muss nun vermieden werden, weil das Indigoroth sonst wieder zerstört, d. h. weiter oxydirt werden würde. Daher wird der tief dunkelroth gefärbte Harn rasch abgekühlt und, um eine weitere Einwirkung der Salpetersäure zu vermeiden, mit kohlensaurem Natron in Substanz versetzt, bis die Reaction eine nur noch schwach saure ist; ein Ueberschuss von kohlensaurem Natron ist zu vermeiden. Die so behandelte Flüssigkeit trübt sich jetzt, der Farbstoff fällt aus und wird abfiltrirt durch ein starkwandiges, am besten mehrfaches, grosses Filter, damit möglichst der ganze verwendete, portionsweise so behandelte Harn durch nur ein Filter geht. Das Filtrat ist nun von braunrother Farbe, völlig frei von Indigoroth. Dieses selbst bleibt, verbunden mit Indigoblau und einigen anderen braunen Farbstoffen und Substanzen vollständig auf dem Filter zurück. Dieser Rückstand, der dem rohen Pflanzenindigo in seiner Zusammensetzung nicht unähnlich ist, nur mehr Indigoroth als Indigoblau enthält, wird mit kohlensaurem Natron und mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Hierauf wird er mit Chloroform im Rückflusskühler auf dem Wasserbade ausgekocht, so lange, bis sich dasselbe nicht mehr schön dunkel purpurn, sondern blau färbt. Die Chloroformauszüge werden abfiltrirt und vereinigt und dann gemeinsam abdestillirt.

Von jetzt an ist das Verfahren ein gleiches, wie beim pflanzlichen Indigoroth. Auch hier fällt beim Abdestilliren des Chloroformextractes das Indigoroth aus (verbunden mit etwas Indigoblau), wenn ein bestimmter Grad der Concentration erreicht ist, während die braunen Farbstoffe gelöst bleiben, d. h. das Chloroform verliert seine kirschrothe Farbe und wird undurchsichtig, braun gefärbt. Die Destillation wird jetzt unterbrochen, die erkaltete braune Lösung vom ausgefallenen Indigoroth abfiltrirt und das letztere nochmals mit kaltem Chloroform nachgewaschen, bis alle braunen Verunreinigungen möglichst entfernt sind und das zum Waschen verwendete Chloroform schön purpurn abfließt. Der Rückstand bildet jetzt ein grauschwarzes krystallinisches Pulver mit einem kupfernen Metallglanze. Er besteht im Wesentlichen aus Indigoroth, enthält aber auch Indigoblau und Spuren von braunen Verunreinigungen. Indigoroth wird nun durch Wiederauflösen in Aether vom

Indigoblan, welches zurückbleibt, getrennt, indem so lange mit immer neuen Mengen Aether extrahirt wird und zwar in der Wärme im Rückflusskühler über dem Wasserbade, als sich noch Indigoroth löst. Die vereinigten Aetherlösungen werden nun so weit abdestillirt, bis sich Krystalle abzuscheiden beginnen, und diese nach 24stündigem Stehen abfiltrirt. Nach einmaligem Umkrystallisiren ist der Farbstoff analysenrein. Die Menge der erhaltenen Substanz im Verhältniss zu den verwendeten Urinquantitäten ist gering. Sie beträgt bei 300 Liter von an Indoxylverbindungen reichen Harnen kaum mehr als 1 Gramm.

Die Krystalle, welche auf die beschriebene Weise erhalten wurden und in ihren Formen und Aussehen (s. v.) mit den aus der Pflanze gewonnenen vollkommen übereinstimmen, wurden alsbald nach dem Trocknen über Schwefelsäure im Exsiccator der Analyse unterworfen.

III. Analyse.

Zur Analyse wurde Indigoroth verwendet, welches ich zum Theil aus menschlichem, zum Theil aus Pferdeharn dargestellt hatte. Herr Dr. Schuftan war wiederum so freundlich, mich dabei zu unterstützen.

a) 0,1044 g Substanz ergaben 0,2796 g CO_2 und 0,040 g H_2O .

b) 0,1124 g Substanz ergaben 0,0122 g N entspr. 10,5 ccm N bei 756 mm Barometerstand und 16° Celsius.

	Gefunden.		Berechnet.
C	73,05	—	73,28 pCt.
H	4,25	—	3,82 -
N	—	10,85	10,68 -

Die Analyse ergab also eine Uebereinstimmung des Harnfarbstoffs sowohl mit dem künstlichen Indigoroth Baeyer's, als mit dem von mir aus der Pflanze dargestellten und analysirten.

IV. Eigenschaften.

Da schon im ersten Theile bei dem aus dem rohen Pflanzenindigo dargestellten Indigoroth die Eigenschaften und Reactionen desselben eingehender beschrieben worden sind, so erübrigt es sich, dieselben hier nochmals ebenso ausführlich zu erwähnen. Es genügt vielmehr, darauf hinzuweisen, dass dieselben selbstverständlich völlig übereinstimmen.

Es soll dafür hier die Gelegenheit benutzt werden, die charakteristischen Merkmale zusammenzufassen, woran man das

Indigoroth auch in ungereinigtem Zustande jederzeit im Harn erkennen kann. Beobachtet man z. B. im Harn eine Rothfärbung, welche man für Indigoroth hält, so genügen zur Erkennung desselben folgende Proben schon im Reagenzglas. Nachdem man die betreffende Harnflüssigkeit mit kohlensaurem Natron neutralisirt hat (ein Ueberschuss ist hier nicht störend), so schüttelt man dieselbe mit Aether aus. Der Aether muss sich schön roth färben. Spektroskopisch muss die rothe Lösung eine Absorption im Grün ergeben. Man hebt dann den Aether vorsichtig ab und verdunstet ihn auf dem Schälchen. Der Rückstand muss sich in Alkohol mit schön rother Farbe lösen. Die alkoholische Lösung, mit etwas kohlensaurem Natron und Traubenzucker versetzt, muss beim Erwärmen eine Küpe geben. Es giebt keinen bis jetzt beobachteten Harnfarbstoff, der sich ähnlich verhält. (Ueber Urorubin u. s. w. s. u.)

V. Das Verhältniss der bekannten und beschriebenen Harnfarbstoffe zum Indigoroth.

In Folgendem sollen die bisher bekannten rothen Harnfarbstoffe, so weit sie überhaupt hier in Betracht kommen, eine nähere Berücksichtigung finden in ihrem Verhältniss zum Indigoroth. Es herrschen nemlich in Bezug auf diese Beziehungen bedeutende Differenzen in der Auffassung der Autoren; selbst die neuesten Lehrbücher weichen hierin wesentlich von einander ab und müssen überdies, um allen Meinungen gerecht zu sein, oft dieselben Harnfarbstoffe mehrmals unter ganz verschiedenen Farbstoffgruppen einreihen. An der Hand der in Vorstehendem festgestellten Eigenschaften des Indigoroths wird eine Sichtung unter den betreffenden rothen Farbstoffen ermöglicht, und es können jetzt die mit demselben identischen von denen geschieden werden, die nichts mit ihm gemeinsam haben.

1. Mit dem Indigoroth identische Harnfarbstoffe.

- a) Rothe Farbstoffe, die in richtiger Weise für Indigoroth gehalten worden sind.

Eine Rothfärbung des Harns, die durch Indigoroth erzeugt wird, ist schon öfters gesehen und beschrieben worden. Als der Erste, welcher neben Indigoblau auch Indigoroth vermuthete,

muss Schunk⁶ bezeichnet werden. Er versetzte den Harn mit Bleiessig so lange noch ein Niederschlag entsteht und hierauf das Filtrat mit einem Ueberschuss von Ammoniak. Der hierdurch entstandene Niederschlag wurde nach oberflächlichem Auswaschen durch kalte, verdünnte Salz- und Schwefelsäure völlig zersetzt und auf's Filter gebracht. War viel Indigo bildender Stoff vorhanden, so überzog sich schon der Filter mit blauer Farbe und ebenso die Oberfläche des braunen Filtrats. Dieses letztere setzte beim Kochen ein dunkles Pulver ab, welches sich zum Theil in Natron mit brauner Farbe löste, zum Theil ungelöst blieb. Der ungelöste Rest bestand aus 2 Theilen, welche durch siedendes Wasser getrennt werden konnten. Den einen, welcher ungelöst blieb, erklärte Schunk für Indigoblau, von dem anderen aber, welcher im Alkohol mit purpurner Farbe sich löste, vermuthet er, dass er identisch sei mit Indirubin der Pflanze. Schunk²⁴ ist es auch gewesen, der Heller's Urrhodin für Indigoroth erklärte und seine Entstehung aus dem Harnindican für wahrscheinlich hielt.

Auch Jaffe machte gelegentlich der Mittheilung seiner Methode der quantitativen Indigobestimmung die Bemerkung, dass durch dieselbe neben Indigoblau auch Indigoroth (und namentlich beim Menschenharn noch andere braune färbende Materien) gebildet werde, welche sich einerseits (die braunen) durch Auskochen mit Wasser und Ammoniak, Indigoroth aber durch Alkohol ausziehen lasse.

F. Hoppe-Seyler² erwähnt in seiner Arbeit über das Vorkommen von Indican im Harn einen rothen Farbstoff. Nach Behandlung des indicanreichen Harns mit Bleiessig, Ammoniak und Salzsäure erhielt er einen Niederschlag von Indigo. Dieses „Rohproduct“ sammelte er auf einem Asbestpfropf und zog dasselbe nach dem Waschen mit Alkohol aus; derselbe färbte sich schön purpurn. Aber auch durch einfaches Kochen des Harnes mit Salzsäure und Salpetersäure erhielt F. Hoppe-Seyler neben Indigoblau auch einen rothen Farbstoff, den er ausdrücklich mit „Indirubin“ bezeichnet, welcher nach ihm in geringer Menge immer entsteht und einen nicht berechenbaren Verlust an Indigoblau bewirkt.

Einen Fall von „rother Indigurie“ beschreiben ferner Nencki⁴

und Niggeler⁵. Es handelte sich um eine Frau, welche an Cervicalmarklähmung litt. Nencki versetzte den braunrothen Harn derselben mit HCl und erwärmte; er isolirte hierdurch einen rothen Farbstoff, der in Alkohol und Eisessig sich schön violettroth löste und trocken erhitzt violettrothe Dämpfe ergab. Da die Frau schon nach 3 Stunden starb, so konnte der Farbstoff nicht näher untersucht werden. Er wurde aber für Indigoroth von Nencki gehalten*). Derselbe erhielt auch bei Thieren nach Fütterung mit Indolkörpern, dem Oxindol und Dioxindol, aus dem Harn durch Erwärmen mit Salzsäure rothe Farbstoffe, welche in Alkohol und Aether löslich waren und mit Indigoroth identisch zu sein schienen.

Niggeler stellte im Nencki'schen Laboratorium nach Eingabe von Isatin aus dem Harn einen rothen Farbstoff dar, den er für identisch mit demjenigen aus dem Harn der an Cervicalmarklähmung erkrankten Frau, also auch für identisch mit Indigoroth hielt. Er erhielt den Farbstoff nicht allein aus dem Hundeharn nach Eingabe von 1,0 Isatin, sondern auch aus dem Menschenharn nach Einnahme von 2,0 Isatin. Der Harn wurde bis zu $\frac{1}{3}$ eingedampft, dann HCl zugesetzt. Er färbte sich erst intensiv roth, wurde dann immer dunkler bis fast schwarz, und endlich nach mehreren Stunden schied sich ein Farbstoff ab, der unter dem Mikroskop aus dunkelbraunrothen amorphen Körnern bestand. In einem Versuche schieden sich aus dem 24stündigen Harn 0,25 g Farbstoff, also $\frac{1}{8}$ des Isatins aus. Der Farbstoff löste sich zu $\frac{2}{3}$ mit prachtvoll carminrother Farbe in Alkohol. Nach dem Verdunsten des Alkohols blieb er als schwarzrothes, metallisch glänzendes Pulver zurück. Dasselbe sublimirte in rothen Dämpfen, jedoch weniger als Indigoblau und setzte schliesslich unter Entwicklung eines eigenthümlichen hornartigen Geruches Oeltropfen an den Wänden des Glases ab. Der Farbstoff war spurenweise in heissem Wasser löslich, sehr leicht in heissem Alkohol und Eisessig, mit carminrother Farbe. In Ammoniak war der Farbstoff schwer, leichter in Natronlauge löslich und wurde daraus durch HCl in amorphen Flocken gefällt. Mit

*) Nencki giebt a. a. O. als lateinische Bezeichnung für Indigoroth „Indigocarmin“, welches mit Indigoroth nicht identisch, sondern indigoblau-disulfosaures Kalium ist.

Ammoniak und Natronlauge gekocht wurde er erst schmutziggelblich, dann entfärbt, ebenso durch Chlorkalk und Salpetersäure in alkoholischer Lösung. Trotz aller Sorgfalt gelang es nicht, den Farbstoff zu krystallisiren. Den in Alkohol nicht löslichen Rückstand, der in Ammoniak aber sich leicht mit brauner Farbe löst, hielt Niggeler für identisch mit Indigobraun, vielleicht auch mit Urohämatin. Zweifelsohne war der von Nencki und Niggeler beobachtete Farbstoff Indigoroth. Nur müssen einige Differenzen beseitigt werden, die zwischen ihren Angaben bestehen und den Reactionen des reinen Indigoroths. Was erstens die spurenweise Löslichkeit in Wasser betrifft, so geht allerdings ganz unreines Indigoroth auch nach meiner eigenen Erfahrung in heisses Wasser, wenn auch in minimaler Menge, über und färbt es rosa; man kann sich aber leicht überzeugen, dass dies keine eigentliche Lösung ist, sondern dass nur eine feine Suspension besteht, die aber beim Filtriren (selbst in der Wärme) auf dem Filter zurückbleibt und beim Erkalten nach einigen Stunden auch in der Flüssigkeit selbst wieder ausfällt. Was die Löslichkeit in kaltem Ammoniak mit brauner Farbe betrifft, so rührt diese Farbe nicht vom Indigoroth her, sondern von dessen braunen Verunreinigungen, die ja von demselben nicht getrennt worden waren.

b) Mit Indigoroth identische, nicht benannte Farbstoffe.

Zu den rothen Harnfarbstoffen, die als Indigoroth nach den angegebenen Eigenschaften aufzufassen, nicht aber näher bezeichnet sind, gehören einige besonders in neuerer Zeit beobachtete. In erster Reihe gehört hierher Leube's pathologischer Harnfarbstoff²⁵. Der Harn einer an Osteomalacie, Cystitis und Nephritis leidenden Kranken, welche auf der Leube'schen Klinik lag, nahm an der Luft eine exquisit dunkelviolette, fast schwärzliche Farbe und zwar von oben her an. Trotz der Vermuthung, dass der Farbstoff mit dem Melanin in Zusammenhang stehen könnte, erwies sich dieselbe als irrig. Es handelte sich vielmehr um einen Farbstoff, der beim Ausschütteln des Harns mit Aether in denselben mit schön dunkelrothvioletter Farbe überging. Beim Abdampfen der ätherischen Lösung blieb eine dunkle harzige Masse übrig. Dieselbe löste sich mit derselben Farbe in Aether, Chloroform, Alkohol und Benzol,

fluorescirte nicht, löste sich aber auch zum Theil in heissem Wasser. Aus der ätherischen Lösung wurde der Farbstoff nicht durch verdünnte Säuren, wohl aber durch verdünnte Alkalien zum grössten Theil ausgeschüttelt. Die alkalische Lösung war gelb. Concentrirte Schwefelsäure zerstörte den Farbstoff; kalte concentrirte Salzsäure löste ihn anscheinend unzersetzt, heisse entfärbte ihn. Mit Zinkstaub in alkoholischer Lösung wurde er entfärbt, an der Luft aber rasch wieder gefärbt. Dasselbe war der Fall, wenn man die mit Zinkstaub versetzte alkoholische Lösung mit Essigsäure schwach ansäuerte. Im Spectrum erschien eine diffuse Auslöschung bei G.

Der beschriebene rothe Harnfarbstoff ist zweifelsohne unreines, mit braunen Bestandtheilen verunreinigtes Indigoroth gewesen. Seine spontane Bildung in einem Cystopyelitisharn deckt sich mit meiner oben erwähnten, eigenen Beobachtung und mit mehreren noch zu erwähnenden Fällen, welche Chiari, Kahler und Plósz veröffentlicht haben. Es scheint der Cystopyelitisharn, falls er indicanreich ist, zur Spontanausscheidung der Indigofarbstoffe sehr disponirt zu sein. Die beschriebenen Reactionen des Leube'schen Farbstoffes stimmen fast alle mit dem Indigoroth überein. Da der rothe Farbstoff, wie stets in den beobachteten Fällen, auch mit beträchtlichen Mengen von braunen Farbstoffen verbunden war und ein Theil derselben ohne Weiteres mit brauner Farbe in die Aetherlösung übergeht, so ist es auch erklärlich, warum beim Schütteln der ätherischen Lösung mit Alkalien letztere sich gelb färben. Dieselben nahmen nemlich aus dem Aether die braunen Bestandtheile auf und liessen das Roth um so reiner zurück.

Was die Löslichkeit des Farbstoffs in heissem Wasser betrifft, so sei hier nochmals betont, dass darin unreines Indigoroth eine Suspension bildet, die aber nach 24 Stunden schon wieder ausfällt, übrigens auch auf dem Filter zurückbleibt. Nicht unwahrscheinlich ist es übrigens, dass die dunkle Farbe des betreffenden Harns zum Theil neben Indigoroth und braunen Farbstoffen von Indigoblau herrührte, dessen Vorhandensein nicht näher untersucht worden ist.

In den Nieren einer an eitriger Pyelitis verstorbenen Frau beobachtete ferner Chiari²⁶ Indigconcremente von gleicher

Farbe und Beschaffenheit, wie der von Ord²⁷ seiner Zeit beschriebene Indigostein. Er beobachtete aber ausserdem noch, dass in diesen Concrementen neben Indigoblau auch ein durch Alkohol extrahirbarer, krystallinischer rother Farbstoff enthalten war.

Einen Fall von Indigurie, bei welchem neben Indigoblau auch ein rother Farbstoff auftrat, beschrieb ferner Kahler²⁸. Es handelt sich um einen — noch lebenden — Kranken mit einseitiger eitriger Pyelonephritis calculosa. Der Harn ist Tage, Wochen, ja Monate lang normal, dann aber einige Tage stark eiterhaltig und in ammoniakalischer Gährung befindlich. 2—3mal im Jahre aber zeigt er folgendes Verhalten. Er riecht stark nach Schwefelwasserstoff, hat eine braunschwarze Farbe und bildet ein blauröth schillerndes Häufchen auf der Oberfläche, einen dunkelblauen Beschlag an den Gefässwänden und ein dunkelblaues Sediment. Der Harn enthält dann reichlich Indigoblau und einen mit Alkohol extrahirbaren rothen Farbstoff.

Vergleicht man diese letztgenannten beiden Fälle mit dem von mir selbst beschriebenen, sowie mit dem von Plósz veröffentlichten und weiter unten noch zu besprechenden, so unterliegt es keinem Zweifel, dass beide, wenn auch nicht näher charakterisirte, Farbstoffe nichts Anderes sein konnten, als Indigoröth.

Gelegentlich seiner Untersuchungen über die physiologische und pathologische Bedeutung des Harnindicans beobachtete ferner Ortweiler²³ das Vorkommen eines rothen Farbstoffes, welcher dann sichtbar wurde, wenn man den indicanreichen Harn nach der Behandlung mit Salzsäure und Chlorkalk nicht mit Chloroform, sondern mit Aether ausschüttelte. Ortweiler äusserte sich damals über diesen Farbstoff nicht näher und meint, dass dessen Natur und Herkunft bis jetzt noch in Dunkel gehüllt sei. In der That war es Indigoröth, wie bereits oben ausgeführt worden ist.

Bei der Darstellung der Indicanprobe nach Jaffe im pathologischen Harn fand Friedr. Müller ausser Indigoblau noch mehrere rothe Farbstoffe, welche sich durch ihre scharf ausgeprägten Spectren auszeichneten. Krukenberg²⁹ hat diese Spectren in ihren ätherischen Lösungen in seine Abhandlung „über einige physiologisch und klinisch wichtige Farbenreactionen“ aufgenommen. Die Darstellungsweise dieser Farbstoffe und ihre

Löslichkeit in Aether, sowie ein Vergleich ihrer Spectren mit dem des Indigoroths machen es wahrscheinlich, dass vielleicht alle, zum mindesten aber der aus dem Harn eines Typhuskranken dargestellte und mit kirschrother Farbe in Aether gelöste Farbstoff nichts Anderes als Indigoroth war.

Hierher gehören endlich die Beobachtungen eines rothen Farbstoffes im Choleraharn, welche Thudichum³⁰ und besonders Wyss³¹ gemacht haben. Letzterem gelang es, aus dem indicanreichen Harn von genesenden Cholera-kranken, besonders in der ersten Portion des Harnes nach der Anurie, einen rothen Farbstoff zu gewinnen. Er fällte nach Schunk's Vorgang solche Harne mit Bleizucker, dann Bleiessig vollkommen aus und setzte zum Filtrat Ammoniak. Den hierdurch erhaltenen Niederschlag zerlegte er mit Salzsäure, filtrirte dann das Chlorblei ab und erhielt nun nach einigem Stehen der salzsauren Flüssigkeit einen gefärbten Niederschlag, welcher ausser Indigoblau einen in Alkohol löslichen, prachtvoll rothen Farbstoff enthielt. Wyss meinte selbst, dass derselbe Indigoroth sei¹⁾.

- c) Mit Indigoroth identische, aber mit einem anderen Namen versehene rothe Farbstoffe.

α) Heller's Urrhodin.

Der Erste, welcher die durch Indigoroth bedingte Purpurfärbung gesehen hat, ist Heller³² gewesen. Er hat dem betreffenden Farbstoff den Namen „Urrhodin“ gegeben. Sein Verfahren war folgendes. Er setzte zum Harn das dreifache Volumen Salzsäure hinzu, wodurch ein blauer Farbstoff, das Uroglaucin, und ein rother, das Urrhodin, sich bildete, oder er versetzte den etwas concentrirten Harn mit Salzsäure oder Schwefelsäure, bis er roth geworden war, neutralisirte nahezu mit Ammoniak oder kohlensaurem Ammonium, verdampfte dann das Ganze bis zur Trockne, wusch den braunen Rückstand mit Wasser und zog denselben aus, so lange dasselbe sich noch färbte. Oder er zog blaue oder amethystrothe Uratsedimente oder ebenso gefärbte, mit Säure gefällte Harnsäure, oder mit Salzsäure aus Harn gefälltes, violett gewordenes Eiweiss mit

¹⁾ Dagegen ist Choleraroth nicht identisch mit Indigoroth, wovon ich mich überzeugen konnte.

Alkohol oder Aether aus. Der rothe Farbstoff löste sich nicht in Wasser, dagegen in Aether und in Alkohol mit carminrother Farbe. Die alkoholische Lösung lieferte beim spontanen Verdunsten dunkelrothe Krystalle.

Die Art der Darstellung, die Löslichkeit in Alkohol und Aether, die Krystallisation aus Alkohol beim Verdunsten spricht dafür, dass der Farbstoff Indigoroth war.

β) Urorubin (Plósz).

Im Jahre 1882 wurde von Plósz eine neue krystallinische farbige Substanz im Harn gefunden. Auf Plósz' Veranlassung hatte v. Udránszky dieselbe isolirt. Es handelte sich wiederum um einen an Cystopyelitis schwer erkrankten Patienten, der einen faulenden, alkalischen, an Ammoniak und Schwefelwasserstoff sehr reichen Harn entleerte. Dieser gelblichweisse Harn, der schon frisch entleert amorphes und krystallinisches Indigoblau enthielt, verfärbte sich, wenn man ihn in dünner Schicht der Luft aussetzte, erst grünlichbraun, dann röthlich, wobei diese Verfärbung, die anfangs bei Luftabschluss wieder verschwand, dauernd wurde. Jetzt ergab die mikroskopische Untersuchung neben bedeutend vermehrtem Indigoblau einen zweiten Farbstoff, der aus violetten, strahlenförmig geordneten Krystallnadeln bestand. Der Farbstoff wurde auf folgende Weise isolirt. Der Harn wurde mit Salzsäure angesäuert und in dünner Schicht 8—10 Stunden der Luft ausgesetzt. Die Flüssigkeit, die erst grünlich, dann schmutzigröthlich geworden war, wurde mit Chloroform oder Aether ausgeschüttelt. Der rothe Farbstoff ging neben Spuren von Indigo (Indigoblau), die spectroscopisch nicht wahrnehmbar waren, über. Derselbe Farbstoff wurde dann auch im Harn eines anderen Kranken beobachtet, der an chronischer Peritonitis litt.

In einer späteren Arbeit theilt Plósz noch weitere Beobachtungen über Vorkommen und Eigenschaften des Farbstoffs mit. Derselbe wurde stets neben Indigoblau durch 20 Minuten langes Sieden gewisser Harne mit 5—10procentiger Salzsäure bei Luftzutritt gewonnen und in Aether oder Chloroform vermischt mit Indigoblau aufgenommen. Nicht jeder Harn enthielt den Farbstoff, jedoch wenn er sich fand, war er stets mit Indigoblau verbunden, wobei bald der eine, bald der andere Farbstoff

überwog und scheinbar unter ähnlichen Bedingungen entstand. Der Farbstoff fand sich in grösserer Menge bei verschiedenen Kranken, deren Verdauung darniederlag, besonders bei Darmverschluss, oft auch bei chronischen Darm- und Magenkatarrhen, bei einer an starker Obstruction leidenden schweren Hysterica, die überdies seit Monaten nur mit der Schlundsonde ernährt wurde, und in noch anderen Fällen.

Die Eigenschaften des Farbstoffes waren folgende:

- 1) Er war in kaltem und heissem Wasser unlöslich.
- 2) Er war löslich in Aether, Alkohol, Chloroform mit prachtvoll granatrother Farbe.
- 3) Er zeigte einen Absorptionsstreifen von D bis F.
- 4) Durch starke Salzsäure und Schwefelsäure wurde der Körper gelöst.
- 5) Salpetersäure entfärbte ihn.
- 6) Auch Alkalien zerstörten ihn, besonders in der Hitze.
- 7) Durch Zinn und Salzsäure wurde er entfärbt.
- 8) Er war nicht identisch mit dem von Brieger beschriebenen Skatolfarbstoff und seine Zersetzungsproducte gaben Indol, nicht Skatol.
- 9) Aus Alkohol und Aether krystallisirte er in rhombischen Blättchen bei sehr langsamer Verdunstung.
- 10) Die nach dem Abdampfen zurückbleibende amorphe Substanz war dunkelkirschroth.
- 11) Der Farbstoff entstand aus einem unbekannten Chromogen des Harns.

12) Er besass, wie Indigoblau, die Eigenschaft, durch Sauerstoffentziehung entfärbt, durch Oxydation reconstruirt zu werden.

Plósz gab dem rothen Farbstoff den Namen Urorubin. Vergleicht man nun diese Eigenschaften, welche von Plósz für Urorubin als charakteristisch bezeichnet wurden, mit denen des Indigoroth, so zeigt sich eine vollkommene Uebereinstimmung. Die Darstellung durch Kochen mit Salzsäure bei Luftzutritt, die Löslichkeitsverhältnisse, die Küpenbildung, die spectroscopischen Eigenschaften, ferner auch die Beobachtung des Farbstoffes in einem Cystopyelitisharn, die sich mit der oben von mir angeführten eigenen Beobachtung völlig deckt, stellt es als zweifellos

hin, dass das Urorubin und Indigoroth ein und derselbe Farbstoff sei*).

2. Von Indigoroth verschiedene rothe Harnfarbstoffe.

a) Der Skatolfarbstoff.

Es ist hier der Ort, den Unterschied ganz besonders hervorzuheben, der zwischen dem Indigoroth besteht und jenem rothen Farbstoff, den Brieger^{11 u. 36} aus dem skatoxylschwefelsauren Kali dargestellt hat, nicht allein, um die Verwechslung mit diesem Skatoxylfarbstoff, welche das Indigoroth so oft erfahren hat, definitiv unmöglich zu machen, sondern auch um diesem Skatoxylroth die richtigen Grenzen anzuweisen, die ihm auf Grund des thatsächlichen, bisher bekannten Untersuchungsmaterials gebühren und um alle nicht hierauf basirten Beschreibungen und Systeme über sein Vorkommen, seine Darstellung und seine Eigenschaften im menschlichen Harn und die Anschauung, als sei dieser Farbstoff als gesicherter Bestandtheil des normalen und pathologischen Harnes aufzufassen, mit allem Nachdruck in das Gebiet der Hypothesen zu verweisen, welche auf Grund der hier niedergelegten Resultate sogar für unwahrscheinlich erklärt werden müssen. So ist es z. B. auch nur eine Hypothese bisher geblieben, dass der normale Harn mehr Skatoxyl-, der pathologische mehr Indoxylverbindungen enthalte, dass Dünndarmerkrankungen mehr Indoxyl-, Dickdarmaffectionen mehr Skatoxylverbindungen im Harn produciren u. a. Besonders muss auch betont werden, dass die rosarothern, purpurrothen und violettrothen Färbungen des Harns beim Erwärmen mit Salzsäure oder bei Anstellung des Jaffe'schen Reaction keineswegs, wie meine Untersuchungen ergeben haben, auf Skatolfarbstoff beruhen, wie dies Brieger¹¹, Jaffe¹², Salkowsky und Leube¹³,

*) Plósz und Udránszky selbst scheinen übrigens später ebenfalls an Indigoroth gedacht zu haben, wenigstens schreibt letzterer in seiner Arbeit über die Huminsubstanzen³⁵, dass es von jenem Farbstoff „dann wahrscheinlich gemacht wurde, dass er mit dem Indirubin identisch sei und neben dem Indigoblau aus dem gemeinsamen Generator derselben entsteht“; wodurch dies wahrscheinlich gemacht wurde, ist allerdings aus der betreffenden Arbeit nicht ersichtlich.

Neubauer und Vogel¹⁴ angenommen haben, sondern einestheils durch Indigoroth bedingt werden (neben Indigoblau), falls es sich um indoxylreiche Harne handelt, andererseits, wo dies nicht der Fall ist, durch einen rothen Farbstoff gebildet werden, den Nencki und Sieber³⁷ bereits beschrieben und dem sie den Namen Urorosein gegeben haben. Ueber denselben wird später berichtet werden.

Nach Brieger's¹¹ Untersuchungen geht Skatol Kaninchen unter die Haut gespritzt als eine Farbstoff liefernde Substanz in den Harn über, welche nach seiner Ansicht „auch die violett-rothen Färbungen gewisser mit der Jaffe'schen Probe auf Indigoblau behandelter Harne bedingt“. Der Farbstoff trat auf, wenn man den Harn so behandelter Kaninchen mit roher Salzsäure versetzte. Es schied sich dann ein schmutzig violetter Farbstoff aus, der kein Indigo war, trocken erhitzt nicht sublimirte, amorph blieb und sich in absolutem Alkohol, Aether, Chloroform und concentrirter Schwefelsäure mit weinrother Farbe löste. Vollständig wurde dieser Farbstoff durch Salzsäure und Chlorkalk abgeschieden. Brieger folgert nun daraus ohne Weiteres für den Menschenharn, dass, falls dieser reich an Indolderivaten ist, der Harn bei der Jaffe'schen Probe blauen Farbstoff liefert, und, falls er reich an Skatolverbindungen ist, er violettroth erscheint. Weiterhin gelang es Brieger²⁰, nach Einverleibung einer grösseren Menge von Skatol aus Hundeharn Krystalle von skatoxylschwefelsaurem Kali darzustellen. Ihre wässrige Lösung ergab, mit $\frac{1}{3}$ Volumen concentrirter Salzsäure in der Wärme zersetzt, beim Erkalten einen amorphen rothen Niederschlag. Derselbe wurde mit Wasser und dann mit Aether, „in den der Indigo*) hineingeht“, ausgewaschen und dann über Schwefelsäure getrocknet. Dieser Skatolfarbstoff war nach Brieger's Untersuchungen unlöslich in Aether und Wasser, leicht löslich aber in Alkohol, den er prächtig burgunderroth färbte. Beim Versuch, ihn beim Eindampfen des Alkohols zu gewinnen, wandelte er sich in eine braune, in Alkohol, Wasser und Aether lösliche Modification um. Der gleiche braune Farbstoff resultirte auch beim Kochen vom skatoxylschwefelsäurehaltigen Urin. Die von Brieger mit dem rothen Skatoxylfarbstoff angestellten Analysen

*) doch nur sehr unvollständig.

haben zu einer einfachen Formel nicht geführt. Mit Zinkstaub erhitzt ergab der rothe Farbstoff und sein in Alkohol unlösliches braunes Product Skatol.

Ausser Brieger will noch J. Otto³⁸ aus dem Harn eines Diabetikers nicht allein skatoxylschwefelsaures Kali in reichlicher Menge, sondern auch einen Farbstoff in derselben Weise, wie Brieger dargestellt haben. Die Reactionen und Eigenschaften seines Skatolfarbstoffes waren nach ihm vollkommen identisch mit den von Brieger angegebenen. Er beschreibt dieselben bedauerlicherweise nicht näher, auch führte eine Analyse des leicht zersetzlichen Farbstoffs zu keinem Resultate. Es ist dies der einzige Fall, in welchem skatoxylschwefelsaures Kali und Skatolfarbstoff aus Menschenharn dargestellt worden sind, alle anderen Bearbeiter, die sich damit beschäftigten, sind trotz eingehender Versuche zu einem negativen Resultate gekommen.

Einen etwas anders beschaffenen Skatolfarbstoff hat Mester³⁹ beschrieben. Während es ihm nicht gelang, trotz reichlicher Skatolfütterung, aus dem Hundeharn das skatoxylschwefelsaure Kali darzustellen, so enthielt der Harn trotzdem eine Substanz, die als Chromogen durch Salzsäurezusatz einen rothen Farbstoff in reichlicher Menge lieferte, welchen Mester seinerseits als Skatolfarbstoff bezeichnete. Dieser rothe Farbstoff bildete sich aus den alkalisch-ätherischen Lösungen, die zur Gewinnung des skatoxylschwefelsauren Kali hergestellt waren. Dieselben enthielten das Chromogen (nach Mester vielleicht Skatoxylglycuronsäure wegen linksdrehender Eigenschaften), welches sich auf Zusatz von concentrirter Salzsäure in den Farbstoff verwandelte. Derselbe fiel in leicht gefärbten Flocken aus, welche in Aether löslich waren. Wenn die ätherische Lösung zu sehr abgedampft wurde, so wandelte sich der Farbstoff in eine braunrothe, später kohlschwarze Masse um, die dann nicht mehr in Aether löslich war. Die Bildung des Farbstoffes durch Salzsäure wurde bei Gegenwart von Reductionsmitteln verhindert, z. B. durch Zusatz von Zinnfolie. Beim Erwärmen und Trocknen spaltete der Farbstoff Wasser ab und verändert sich an der Luft, indem er anfangs heller gefärbt, bald dunkel violett, später mehr braun wurde. Er besass basische und saure Eigenschaften, war

in Salzsäure und Schwefelsäure mit kirschrother, in Alkalien und Ammoniak mit gelber Farbe löslich, ferner mit dunkelvioletter in Alkohol, Amylalkohol, Aether und Chloroform. In Wasser war er unlöslich. Am besten löste er sich in frischem Zustande. Einige Zeit an der Luft aufbewahrt wurde er in Aether schwer löslich, besser noch auf einen geringen Zusatz von Säure, während ein Ueberschuss derselben den Farbstoff dem Aether wieder entzog. Wurde eine alkoholische Lösung des Farbstoffs mit Aether geschüttelt, so trat im Aether eine schön grüne Fluorescenz auf. Unter dem Einfluss der Luft nahm dieselbe bald eine mehr röthliche Nuance an.

Schon ein oberflächlicher Vergleich der Eigenschaften und Reactionen aller dieser Skatolfarbstoffe zeigte die wesentlichsten Unterschiede von denen des Indigoroths. Erstere sind zunächst leicht zersetzliche Substanzen, letzteres eine sehr beständige Verbindung, nur durch kaustische Alkalien in der Hitze und durch reducirende und oxydirende Substanzen angreifbar. Der Brieger'sche Skatolfarbstoff ist in Aether^{*)} unlöslich, das Indigoroth ziemlich leicht löslich; ersteres bildet Skatol bei der Reduction, letzteres Indol. Was vollends den Mester'schen, äusserst veränderlichen und zersetzlichen Farbstoff betrifft, so stimmt fast keine Reaction mit derjenigen des Indigoroths überein. Es erscheint übrigens nach den Unterschieden, die sich bei den von Brieger und Mester dargestellten Skatolfarbstoffen ergaben, die Frage über Vorkommen und Beschaffenheit derselben im Thierharn, selbst wenn man Skatol einverleibt, noch nicht erledigt, zumal beide Farbstoffe nicht genügend (Analyse, Krystalle u. s. w.) charakterisirt sind. Was aber das Vorkommen eines derartigen Farbstoffes im normalen und pathologischen Harn des Menschen betrifft, so sei hier nochmals auf das Nachdrücklichste betont, dass mir trotz der grossen Zahl der Versuche niemals auch nur neben dem Indigoroth ein ähnlicher Farbstoff begegnet ist, dass alle Violettfärbungen des Menschenharns bei der Jaffe'schen Probe und in anderen Fällen sich in die

^{*)} In seiner ersten Mittheilung jedoch führt Brieger (s. o.) den Aether als Lösungsmittel des Skatolfarbstoffes an; der Widerspruch ist nicht aufgeklärt.

beiden Componenten Indigoblau und Indigoroth*) auf-
lösen liessen und dass auch die Rothfärbungen auf
letzteres oft zurückzuführen waren, dass aber da, wo
sich kein Indigoroth als Ursache für dieselbe fand,
stets nur diejenigen Rothfärbungen verantwortlich ge-
macht werden konnten, die im Nächstfolgenden schon
behufs ihrer Unterscheidung vom Indigoroth berührt
werden sollen, kurz, dass kein Bedürfniss vorliegt,
irgend welche Rothfärbungen des normalen und patho-
logischen Menschenharns auf einen beim Menschen und
ohne Einverleibung von Skatol doch nur hypothetischen
Skatolfarbstoff zurückzuführen**).

*) Wenn z. B. ein Harn, den man mit der Jaffe'schen Probe vorschrifts-
mässig im Reagenzglase behandelt hat, sich nicht blau, sondern violett
färbt, so trennt man beide Farbstoffe auf folgende Weise. Man schüt-
telt gründlich mit Chloroform aus und hebt dasselbe dann nach eini-
gem Stehen vorsichtig mit der Pipette heraus in ein anderes Reagenz-
glas, schüttelt die Chloroformlösung in demselben mit einer Lösung
von Ammoniak oder kohlensaurem Natron aus (um gewisse braune
Verunreinigungen zu entfernen), hebt es nochmals heraus und ver-
dunstet es auf einer Porzellanschale. Extrahirt man den Rückstand
jetzt mit Aether, so färbt sich dieser nur schön rosaroth, das Indigo-
blau bleibt zurück und kann in heissem Chloroform gelöst werden.
Natürlich sind beide Farbstoffe noch sehr unrein.

**) Mester und Rumpel haben sich neuerdings von Neuem zu Gunsten
des Vorkommens eines Skatolfarbstoffes im menschlichen Harn verwandt
und zwar zu einer Zeit, wo die (bereits angekündigten) vorstehenden
Untersuchungen noch nicht zum Abschluss gekommen waren. Sie
haben sich bemüht, auch die burgunderfarbene Rosenbach'sche Reaction
auf einen Skatolfarbstoff zurückzuführen, allerdings nur theoretisch,
ohne irgend einen Versuch einer Darstellung des Farbstoffs und eine
genauere Untersuchung desselben anzustellen. Wenn Mester und
Rumpel schreiben, dass die sichere Entscheidung der Frage, ob der
rothe Farbstoff der Rosenbach'schen Reaction ein Skatolfarbstoff sei,
oder ein Indolderivat, erst dann möglich sein wird, wenn es gelungen
sein sollte, einen der beiden Körper krystallinisch aus dem Harn zu
gewinnen, so ist wohl nach vorstehenden Untersuchungen diese Frage,
wiewohl nicht zu ihren Gunsten, gelöst. Uebrigens scheinen Mester
und Rumpel die Arbeit Ewald's⁴³ (s. o.) gänzlich übersehen zu haben,
welcher auf anderem Wege zu dem gleichen Resultate gelangt, dass der
Farbstoff als ein Indolderivat aufzufassen ist. Um aber der Annahme
auch hier zu begegnen, dass der rothe Farbstoff, der in den Aether

b) Das Urorosein.

Grössere Mengen von Indigoroth lassen sich schon dem Aussehen nach in den mit Säuren und Oxydationsmitteln behandelten Harnen mit ziemlicher Sicherheit erkennen; die purpurne, tief rothe oder violette Farbe, welche der Harn dann zeigt, ist charakteristisch für Indigoroth und kann im Allgemeinen vor Verwechselung schützen. Schwieriger aber gestaltet sich die Möglichkeit, das Indigoroth zu erkennen, wenn nur geringe Mengen im Harn vorhanden sind, denn der Harn nimmt, falls er wenig Indigoroth enthält, eine kirsch- oder rosaroth, nur wenig in's Violette spielende Farbennüance an. Hier wäre eine Verwechselung mit gewissen anderen Farbstoffen möglich, wenn nicht durch bestimmte, einfache Reactionen eine sichere Unterscheidung sich ermöglichen liesse. Es sind im Wesentlichen zwei rothe Farbstoffe, welche unter den genannten Umständen mit dem Indigoroth dem Aussehen nach verwechselt werden können.

In erster Reihe kommt hier das von Nencki und Sieber³⁷ im pathologischen Harn gefundene Urorosein in Betracht, welchem wegen seiner äusserlichen Aehnlichkeit mit Indigoroth auch das Schicksal des letzteren auf einen Skatolfarbstoff bezogen zu werden, ebenfalls zu Theil geworden ist, wie schon erwähnt wurde.

Das Urorosein entsteht nach Nencki und Sieber im pathologischen Harn schon in der Kälte, wenn man 50—100 ccm Harn mit 5—10 ccm Salz- oder Schwefelsäure (Mineralsäuren, nicht aber z. B. Essigsäure) versetzt. Die gelbliche Farbe des Harns geht dann in eine schöne Rosafarbe über. Die Eigenschaften des Urorosein sind folgende:

1) Leichte Löslichkeit in Amylalkohol, fast ebenso leicht in saurem Aethylalkohol, weniger in neutralem Aethylalkohol, sehr geringe in Essigäther.

2) Unlöslichkeit in Chloroform, Aether, Benzol, Schwefelkohlenstoff.

übergeht, nicht ein einheitlicher, sondern dass, wie Mester es für nicht ausgeschlossen hält, vielleicht zwei Farbstoffe, Indigoroth und der Skatolfarbstoff, darin enthalten seien, so sei hier bemerkt, dass in den Aetherlösungen des rothen Farbstoffes stets nur der eine, das Indigoroth, vorhanden war.

3) Ammoniak und kohlensaure Alkalien entfärben die rothe Lösung sofort; Säurezusatz führt die Farbe wieder herbei.

4) Durch Zinkstaub wird der Farbstoff entfärbt, gewinnt aber beim Stehen an der Luft seine alte Farbe wieder.

5) Er besitzt in amylalkoholischer Lösung einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen D und E im Grün, etwas mehr nach D zu.

6) Er ist sehr unbeständig, verblasst schon nach wenigen Stunden durch Zersetzung und zersetzt sich auch beim Eindampfen. Auch durch Fäulniss wird er zerstört.

7) Er färbt Wolle rosaroth.

Zu den Beobachtungen von Nencki und Sieber sollen noch wenige eigene hinzugefügt werden. Bei Zusatz von Salzsäure in der Kälte entsteht der Farbstoff oft erst nach langem Stehen, wenigstens wenn die Probe im Reagenzglase angestellt und nicht in dünner Schicht der Luft ausgesetzt wird. Beim Erwärmen jedoch mit Salzsäure oder Salpetersäure (15 Tropfen auf 10 ccm uroroseinreichen Harns) entsteht der Farbstoff sofort, wenn er überhaupt vorhanden ist, ebenso auch bei Anstellung der Jaffe'schen Probe durch Salzsäure und Chlorkalk. Entfärbt man uroroseinhaltigen Harn mit Bleiacetat, so tritt die Rothfärbung durch Urorosein erst recht schön zu Tage. Der Farbstoff bleibt beim Filtriren, obschon der rosaroth Harn immer eine feine Trübung zeigt, doch auf dem Filter zurück, fällt übrigens bei längerem Stehen des Harns aus demselben als rosafarbenes Pulver aus. Im Ochsenharn findet sich ein Farbstoff (neben reichlichen Mengen Indigoroth), der in seiner Reaction mit dem Urorosein vollständig identisch ist, und zwar in so reichlichen Mengen, dass vielleicht eine genauere Individualisirung des Farbstoffs von hier aus ermöglicht werden kann. Urorosein findet sich übrigens in geringen Spuren auch in normalen Harnen, wovon man sich leicht überzeugen kann, wenn man ihn mit dem halben Volumen HCl versetzt und etwas erwärmt. Filtrirt man dann, so bleibt eine geringe Menge Urorosein auf dem Filter zurück.

Um nun Indigoroth von Urorosein zu unterscheiden, genügt nur der Zusatz von Alkalien (z. B. kohlensaurem Natron) oder Aether. Das Urorosein wird nemlich von Alkalien

sofort entfärbt und geht ausserdem (auch ohne Zusatz von Alkali) nicht in den Aether über, während bei Anwesenheit von Indigoroth sich der Farbstoff schön roth löst. Im Uebrigen unterscheidet sich das Urorosein nicht allein durch seine Löslichkeitsverhältnisse vom Indigoroth sehr wesentlich, sondern auch durch sein Absorptionsband, welches zwar auch im Grün liegt, aber doch von ganz anderer Beschaffenheit, d. h. schmal und scharf begrenzt ist und eine andere Lage im Grün einnimmt. Es sei übrigens darauf hingewiesen, dass Urorosein auch mit und neben Indigoblau und Indigoroth bei der Jaffe'schen Probe auftritt. In die Chloroform- und Aetherausschüttelungen geht es nicht, wie das Indigoroth, über.

- c) Der Unterschied von der rothen Farbenveränderung, die der gelbe Harnfarbstoff durch Säurezusatz erleidet.

Die andere der hier in Betracht kommenden Rothfärbungen, welche mit Indigoroth verwechselt worden sind, ist die, welche der gelbe Harnfarbstoff nach Zusatz von Säuren erfährt. Jeder Harn nehmlich, ob heller oder dunkler von Farbe, erhält nach Zusatz von organischen oder anorganischen Säuren, mit oder ohne Anwendung von Wärme, eine Farbenveränderung in's Rothe. Dieselbe ist zuweilen wenig deutlich ausgesprochen und der Harn erscheint dann nur in dicker Schicht roth, in dünner Schicht (im Reagenzglase) aber nur orange. Zuweilen wird der Harn aber auch in dünner Schicht kirschroth oder ziegelroth, und diese Farbe kann dann zu Verwechselungen mit Indigoroth Veranlassung geben. Der Farbstoff, der sich hierbei bildet, scheint mit dem gelben Harnfarbstoff selbst in Verbindung zu stehen, denn beim völligen Entfärben des Harns mit basischem Bleiacetat tritt er im farblosen Filtrat selbst bei ergiebigem Zusatz von Säure nicht wieder auf. Beim Filtriren bleibt der Farbstoff nicht, wie das Indigoroth oder das Urorosein, auf dem Filter zurück, sondern er geht gelöst hindurch. Ein charakteristischer Spectralstreifen ist nicht vorhanden. Durch Alkalisierung verschwindet er, um durch Ansäuern wieder aufzutreten. Beim Ausschütteln mit Aether und Chloroform löst er sich nicht in demselben. Bei sehr langem Erhitzen, ebenso bei längerem Stehen, geht der Farbstoff in Braun über, wobei sich

ein dunkelbrauner Niederschlag bildet. Desgleichen zersetzt sich der Farbstoff beim Eindampfen.

Diese rothen Farbenveränderungen des normalen Harnfarbstoffes sind nach den interessanten Untersuchungen v. Udranszky's³⁵ auf die Bildung von Huminsubstanzen zurückzuführen und bilden ein Uebergangsstadium zu jenen dunkelbraunen Endproducten, welche erst nach längerem Kochen sich bilden.

Vom Indigoroth lässt sich der Farbstoff auf dieselbe Weise unterscheiden, wie das Urorosein, er wird auch durch Alkali entfärbt und geht in den Aether nicht über. Vom Urorosein selber unterscheidet er sich dadurch, dass er beim Filtriren in Lösung bleibt, keinen Absorptionsstreifen giebt und im Filtrat von Bleiacetatniederschlag nicht mehr zum Vorschein kommt.

d) Uroerythrin.

Das Uroerythrin, der Farbstoff des Sedimentum lateritium dürfte wohl schwerlich zu Verwechselungen mit dem Indigoroth führen, doch sei er hier der Vollständigkeit halber als rother Harnfarbstoff, wie auch die nächstfolgenden erwähnt. Das Uroerythrin ist wenig genau untersucht. Es bildet ein rosaroths bis krebseroths Pulver, welches beim Filtriren der betreffenden Harne auf dem Filter zurückbleibt. Es ist sehr zersetzlich, in Aether und Chloroform unlöslich und färbt sich mit kaustischem Alkali grün. Beim Ansäuern kehrt dann die ursprüngliche Farbe nicht wieder zurück. Durch diese Eigenschaften ist das Uroerythrin vom Indigoroth leicht zu unterscheiden.

e) Urohämatin.

G. Harley stellte 1854 aus normalem Harn einen rothen Farbstoff, allerdings in durchaus unreinem Zustande, dar, der nach seinen Angaben stark eisenhaltig war. Der Farbstoff, von ihm Urohämatin genannt, entstand, wenn man den alkoholischen Extract des zur Syrupdicke eingedampften normalen Harnes mit Kalkmilch kochte; es bildete sich dann ein rother Niederschlag. Derselbe wurde mit Salzsäure zerlegt und mit Aether ausgeschüttelt, die ätherische Lösung gewaschen und verdunstet, wobei eine dunkelrothe Substanz zurückblieb. Dieselbe löste sich in Alkohol, Aether, Chloroform, kaustischen Alkalien und hinterliess beim Verbrennen einen starken Rückstand von Eisenoxyd.

Diese letzte Eigenschaft, ferner auch die Art der Darstellung und die Löslichkeit in Alkalien schützen vollkommen vor einer Verwechselung mit Indigoroth (falls überhaupt der Farbstoff ein einheitliches Ganzes und nicht ein Gemenge verschiedener Substanzen darstellt). Es ist bisher im Harn nicht wieder aufgefunden worden.

f) Giacosa's Farbstoff.

Der von Giacosa⁴² neuerdings beschriebene rothe Harnfarbstoff ist ebenfalls eisenhaltig. Er entstand aus einem Chromogen des normalen Harns nach Versetzen desselben mit Salzsäure in der Kälte (nach vorheriger Fällung mit neutralem Bleiacetat und Entbleien mit Schwefelwasserstoff) und Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Amylalkohol. Mit basischem Bleiacetat durfte jedoch der Harn nicht behandelt werden, da sonst das Chromogen mit ausgefällt wurde. Nach einstündigem Stehen wurde der rubinrothe Amylalkohol abgehoben, mit Wasser säurefrei gewaschen*) und abdestillirt. Der mit lauwarmem Wasser und mit verdünntem Ammoniak gewaschene und getrocknete Rückstand wurde mit absolutem Aether aufgenommen und das Verfahren nochmals wiederholt. Beim Verdunsten des Aethers hinterblieb ein braunes Pulver, das beim Verbrennen 0,45 pCt. fast nur aus Eisen bestehender Asche lieferte. Der Farbstoff war schmelzbar bei 100—120°, löslich in Alkohol, Aether und Chloroform. In letzteren beiden zeigte er eine grüne Fluorescenz. Beim Kochen mit Salzsäure wurde er zerstört. Mit dem Urohämatin hatte er eine gewisse Aehnlichkeit. Seine Schmelzbarkeit, Fluorescenz, sein Eisengehalt, die Zerstörbarkeit durch Salzsäure unterscheiden den (ebenfalls nur ungenügend charakterisirten) Farbstoff vollständig vom Indigoroth.

g) Urorubrohämatin.

Dieser von Baumstark neben Urofuscohämatin aus dem Harn eines Leprakranken dargestellte rothe Farbstoff sei hier nur erwähnt, um zugleich hervorzuheben, dass seine Eigenschaften von denen des Indigoroth vollständig verschieden sind.

*) Dies gelingt nach v. Udránsky's Untersuchungen nicht. Uebrigens ist es nach den Untersuchungen ebendesselben nicht ausgeschlossen, dass der Amylalkohol selbst bei der Bildung des Farbstoffes betheiligt ist.

C. Darstellung von Indigoroth aus Indigoblau.

Bei Gelegenheit der Feststellung der Analyse des Indigoroths ist auch auf seine nahe Verwandtschaft mit Indigoblau hingewiesen worden. Es ist ferner in Vorstehendem wiederholentlich darauf aufmerksam gemacht worden, dass beide Farbstoffe stets vereint in der Natur vorkommen, dass nicht allein in dem rohen Indigo der Pflanzen und in den Zersetzungsproducten des Schunk'schen Pflanzenindicans, sondern auch überall da im Harn sich Indigoroth findet, wo Indigoblau auftritt (und umgekehrt), und dass nicht allein bei Zersetzung des an Indoxylverbindungen reichen Harns durch Säuren und Oxydationsmittel, sondern auch durch Gährung und Fäulniss immer beide in Gesellschaft, bald der eine, bald der andere in grösseren Mengen, sich bilden. Es ist ferner kein Zweifel, dass das reine indoxylschwefelsaure Kali bei seiner Zersetzung neben Indigoblau auch Indigoroth producirt, denn als solches muss jener rothe Farbstoff aufgefasst werden, den Baumann und Brieger²⁰ und Baeyer⁸ als Zersetzungsproduct desselben beschrieben haben. Auch bei der künstlichen Darstellung des Indigoblaus tritt es oft neben demselben auf, so z. B., wenn man nach Baeyer's Verfahren Isatin mit Dreifachchlorphosphor und Chlormethyl oder wenn man Isatinchlorid mit Eisessig behandelt, welcher Zinkstaub oder Jodwasserstoffgas enthält.

Dieses gemeinsame Vorkommen, mehr noch so viele gemeinsame Eigenschaften, vor Allem aber die Isomerie und die Aehnlichkeit der Constitutionsformeln legten die Frage nahe, ob nicht der eine Körper aus dem anderen entstünde und ob man nicht durch geeignete Maassnahmen den einen in den anderen überführen könnte.

Bisher war das Indigoroth nie aus Indigoblau, sondern auf anderem Wege dargestellt worden. Es war Baeyer⁸ während seiner ausgedehnten Untersuchungen über Natur und Eigenschaften des Indigo u. a. auch gelungen, durch Vereinigung von Indoxyl mit Isatin in einer Lösung von kohlen saurem Natron Indirubin in krystallinisch reinem Zustande zu erzeugen und diesen künstlichen Farbstoff, dem er in richtiger Erkenntniss der Identität mit dem im natürlichen Pflanzenindigo vorkommenden

eben den Namen Indirubin gegeben hatte, genauestens zu untersuchen. Aber es musste von vornherein als unwahrscheinlich angenommen werden, dass auch der natürliche Farbstoff auf eben demselben Wege durch Zusammentritt der beiden Factoren Indoxyl und Isatin in einer Lösung von kohlensaurem Natron sich bilde. Weder die Küpenflüssigkeit der Pflanzen, noch der mit Säuren und Oxydationsmitteln behandelte Harn enthält die Bedingungen für den Eintritt einer derartigen Reaction, es musste hier also eine andere Entstehungsweise des Indigoroth angenommen werden und zwar am ehesten ein directer Uebergang aus Indigoblau, aus den erwähnten Gründen.

Ich versuchte es daher, Indigoblau direct in Indigoroth überzuführen. Wegen der Isomerie der beiden Substanzen konnte von vornherein nur ein Verfahren angewendet werden, welches eine Umlagerung der Molecüle herbeiführte, ohne irgend welche zersetzende, oxydirende oder reducirende Wirkungen auszuführen.

Bei den mannichfaltigen, lange vergeblich fortgesetzten Versuchen war es mir aufgefallen, dass der jodhaltige, violett-rothe Dampf, den reines sublimirendes Indigo erzeugt, spectroscopisch untersucht neben dem Absorptionsbande des Indigoblau im Orange, auch das des Indigoroth im Grün besitzt. So sah ich mich veranlasst, zu untersuchen, ob vielleicht Indigoblau nach der Sublimation sich theilweise in Indigoroth umgesetzt habe.

Diese Vermuthung bestätigte sich vollkommen: Wenn man eine geringe Menge reinen, krystallisirten Indigoblaus auf den Boden eines Reagenzglases schüttet und Aether hinzufügt, so bleibt derselbe auch bei kräftigem Schütteln damit farblos und klar. Wenn man aber vorher das Indigoblau vorsichtig sublimirt und dann Aether hinzufügt, so färbt sich derselbe schön carmoisinroth oder purpurn durch gebildetes Indigoroth. Zur genaueren Anstellung des Versuchs und zur Gewinnung grösserer Mengen verfuhr ich folgendermaassen:

Absolut reines, gut krystallisirtes Indigoblau, wie ich solches aus der chemischen Fabrik von Schuchardt bezog, das beim Kochen mit Alkohol oder Chloroform sich nur rein blau löst, wurde in einer Röhre möglichst vollkommen und dabei vor-

sichtig sublimirt und mit heissem Chloroform extrahirt; dasselbe färbt sich nun schön roth. Dieses Verfahren wurde sofort wiederholt, bis genügende Mengen rothgefärbten Chloroforms vorhanden waren, die dann vereint und genau so weiter behandelt wurden, wie dies für das pflanzliche und Harn-Indigoroth oben eingehender beschrieben worden ist. Das Resultat waren Krystalle von Indigoroth, in welches ein Theil des Indigoblau übergeführt war und welche übrigens alle Eigenschaften und Reactionen des Indigoroths besaßen; eine nochmalige Analyse erschien überflüssig. Neben demselben hatten sich bei der Sublimation übrigens auch rothbraune und braune Farbstoffe gebildet, welche als Zersetzungs- bzw. Oxydationsproducte des Indigoblau betrachtet und als wahrscheinlich identisch mit den im Harn und Pflanzen beobachteten angesehen werden mußten.

Eine Umwandlung von Indigoblau in Indigoroth und zwar durch einfache Sublimation war hiermit erwiesen. Hierdurch wird aber auf die Bildung des Indigoroth auch in natürlichen Producten, insbesondere im Harn, ein Licht geworfen. Dass für das Indigoroth als Indolderivat ebenso, wie für das Indigoblau die Indoxylverbindungen des Harnes als Muttersubstanzen angesehen werden müssen, ist schon oben erwähnt worden, es bedarf hier nur die Frage eine Erklärung, weshalb sich in gewissen Fällen und bei gewissen Methoden der Darstellung bald der rothe, bald der blaue Farbstoff bildet.

Zunächst beweist die Möglichkeit und die Art der Darstellung des Indigoroth aus Indigoblau, dass der Uebergang des Einen in das Andere ein sehr leichter ist. Schon einfaches Erhitzen ist im Stande, die Molecüle des Indigoblau so umzugruppiren, dass das isomere Indigoroth entsteht. In statu nascendi der beiden Farbstoffe wird dieser Vorgang, die Bildung des Indigoroth, noch leichter zu Stande kommen, da es sich hier nur darum handelt, dass nach Zersetzung und Oxydation des Indoxyls die Molecüle sich nicht alle zu Indigoblau, sondern ein Theil zu Indigoroth zusammenlegen. Dass dieser Vorgang wirklich stattfindet, beweist die Thatsache, dass beide stets gemeinsam vorkommen.

Ferner aber wird durch die Gewinnung des Indigoroth durch Sublimation des Indigoblau klar gelegt, warum gewisse Methoden

der Zersetzung der Indoxylverbindungen mehr Indigoroth, andere mehr Indigoblau produciren. Das Indigoroth ist ein Product der Wärmewirkung, und so wird es erklärlich, weshalb diejenigen Maassnahmen, welche in der Wärme vorgenommen werden (Rosenbach'sche Reaction, Jaffe'sche Probe in der Wärme) Indigoroth in grösserer Menge und wenig Indigoblau, und diejenigen, welche in der Kälte sich abspielen (Jaffe'sche Probe in der Kälte) bei weitem mehr Indigoblau erzeugen. Schon in statu nascendi lagern sich unter dem Einfluss der Wärme die Molecüle in ersterem Falle grösstentheils zu Indigoroth an einander, im letzteren zu Indigoblau. Indigoroth ist dabei als Wärmeproduct (trotz der Isomerie) ein Erzeugniss einer etwas energischeren Oxydation, als Indigoblau.

Sind nun auch die Beobachtungen über das Indigoroth in Vorstehendem zu einem Abschluss gebracht worden, so ist dieser Farbstoff doch nicht der einzige Harnfarbstoff, der von mir in den Kreis genauer Untersuchungen gezogen worden ist. Die Rosenbach'sche Reaction wird, wie schon oben erwähnt, nicht nur durch das Indigoroth, erzeugt, sondern sie setzt sich auch noch aus anderen Farbstoffen, insbesondere, wie der Entdecker derselben es selbst schon hervorhebt, aus einer braunen Componente zusammen. Ich bin nun auch auf diese seither näher eingegangen, habe jedoch noch nicht die Untersuchungen darüber zum Abschluss bringen können. Nur so weit sind die letzteren gediehen, dass ich mehrere braune Harnfarbstoffe von verschiedenen Eigenschaften, wenn auch noch unrein, isoliren konnte, welche sicher ebenfalls ein Interesse beanspruchen, insofern sie jedenfalls mit den braunen Färbungen in Beziehung stehen, die der Harn durch Behandeln mit Säuern und Oxydationsmitteln erleidet.

Hier am Schluss der Arbeit seien diese Farbstoffe vorläufig nur erwähnt, um nach gelungener Reindarstellung ausführlicher beschrieben zu werden.

Es war oben S. 44 und 45 bei der Angabe der Methode der Darstellung des Indigoroths aus dem Harn erwähnt worden, dass in dem Chloroformextract der noch unreinen Substanz auch gewisse braune Farbstoffe enthalten sind, welche im Chloroform

leichter löslich sind, als Indigoroth, daher auch schon in der Kälte in dasselbe leicht übergehen und so vom Indigoroth, welches nur in heissem Chloroform leicht löslich ist, zu trennen sind.

Folgende Substanzen lassen sich nun aus der vom Indigoroth getrennten Masse isoliren. Ligroin nimmt aus derselben einen rothbraunen, schön fluorescirenden Farbstoff (natürlich nicht Urobilin) auf, welcher in Alkohol, Aether und Chloroform leicht löslich ist. Aus dem Ligroinrückstand nimmt Aether einen rothbraunen Farbstoff auf, welcher durch Zusatz von Ligroin als braunes Pulver wieder gefällt wird und in Alkohol und Chloroform ausserdem löslich ist. Es bleibt dann noch ein dunkelbrauner Rückstand, der nur in Chloroform und Alkohol mit chokoladenbrauner Farbe löslich und durch Ligroin als dunkelbraunes Pulver fällbar ist. Ausser diesen drei Farbstoffen ist noch eine farblose Substanz zu berücksichtigen, welche in den Ligroinextract mit übergeht und daraus durch wiederholtes Verdunsten und Wiederauflösen allmählich von jenem mitgelösten fluorescirenden Farbstoffe getrennt werden kann. Diese Substanz ist ein fettglänzender und fettig sich anfühlender, leicht krystallisirbarer Körper, der schon zwischen 60 und 70° schmilzt und in Alkohol, Aether, Chloroform und Ligroin löslich ist. Alle diese Substanzen bedürfen jedoch noch genauerer Untersuchungen.

Es sei endlich darauf aufmerksam gemacht, dass auch aus dem Pflanzenindigo zum Theil dieselben braunen Farbstoffe isolirt werden können und dass es wahrscheinlich ist, dass die genannten Harnfarbstoffe zum Theil als Indigofarbstoffe ebenfalls anzusehen sind.

Meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Rosenbach, bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Ueberlassung des Materials zu grossem Danke verpflichtet und sprechen denselben ihm auch an dieser Stelle aus.

L i t e r a t u r.

1. Heller, Ueber die Farbstoffe des Harns, Uroxanthin, Uroglauclin und Urrhodin. Heller's Archiv 1845. S. 161. 1846. S. 19, 536, 539. Neubauer und Vogel, Harnanalyse. 9. Aufl. 1890. S. 96.

2. F. Hoppe-Seyler, Ueber Indican als constanten Harnbestandtheil. Dieses Archiv. 1863. Bd. 27. S. 388.
3. Jaffe, Ueber den Nachweis und die quantitative Bestimmung des Indicans im Harn. Pflüger's Arch. III. S. 448.
4. Nencki, Ueber die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe und über die Pankreasverdauung. Berichte d. deutsch. chem. Ges. VII. 1874. S. 1593. Zur Geschichte des Indols und der Fäulnisproducte im thier. Organismus. Ber. d. deutsch. chem. Ges. IX. 1876. S. 229.
5. Niggeler, Ueber Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe. Archiv für experim. Pathol. III. 1875. S. 70.
6. Schunk, Ueber das Vorkommen von Indigoblau im Harn. Mem. of the Lit. and Phil. Soc. of Manchester. Vol. XIV. p. 239. April 1857. Erdmann's Journ. f. prakt. Chem. Bd. 75. 1858.
7. Berzelius, Lehrbuch. VII. 187 u. Poggend. Annal. X. 105, 107. Kolbe, Handwörterbuch der reinen und angewandten Chemie. IV. S. 39.
8. Baeyer u. Emmerling, Reduction des Isatins zu Indigoblau. Ber. d. deutsch. chem. Ges. III. 1870. Ueber die Einwirkung des Fünffachchlorphosphor auf Isatin und verwandte Substanzen. Ber. d. deutsch. chem. Ges. XII. 1879. S. 456. Ueber die Verbindungen der Indigogruppe. Ber. XIV. 1881. S. 1791.
9. O. Rosenbach, Ueber eine eigenthümliche Farbstoffbildung bei schweren Darmleiden. Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 1. Zur Symptomatologie und Therapie der Darminsuffizienz. Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 13 u. Sitzungsber. d. medicin. Sect. d. schles. Ges. f. vaterl. Cult. zu Breslau 31. Mai 1889. Ueber die Punction des Darms bei Darmverschluss. Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 17. Die pathogenet. Bedeutung der burgunderrothen Urinfärbung. Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 22.
10. H. Rosin, Bildung und Darstellung von Indigoroth aus dem Harn. (Vorläuf. Mittheilung, Centralbl. f. klin. Med. 1889. No. 29.)
11. L. Brieger, Ueber die flüchtigen Bestandtheile der menschl. Excremente. Ber. d. deutsch. chem. Ges. X. 1877. S. 1027.
12. Jaffe, dieses Archiv Bd. 70. S. 73.
13. Leube u. Salkowski, Die Lehre vom Harn. S. 155 (1882). Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 22 u. 23.
14. Neubauer u. Vogel (Huppert u. Thomas), Analyse des Harns. 9. Aufl. 1890. I. S. 99 u. II. S. 71.
15. Schunk, Philos. Mag. and Journ. of Sc. IV. Ser. Vol. XV. No. 97, 98, 99 und Journ. f. pr. Chem. (neue Folge) Bd. 73 S. 268, Bd. 79 S. 99 u. 174.
16. Cit. nach Kolbe, Handwörterbuch. IV. S. 39.
17. Forrer, Ueber das Indirubin. Ber. d. d. chem. Ges. 17. 1884. S. 975.
18. Fr. Müller, Indicanausscheidung durch den Harn bei Inanition. Mittheilungen a. d. Würzb. med. Klin. II. 1886. S. 159.

19. Senator, Centralbl. f. d. med. Wiss. 1877.
20. Baumann und Brieger, Zeitschr. f. phys. Chem. III. S. 254. 1879.
Ber. d. d. chem. Ges. 12. S. 2166. Baumann u. Tiemann, Ber.
d. d. chem. Ges. 12. S. 1098 u. 1192. 1879 u. 13. S. 408. 1880.
21. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. 14. S. 307. 1881.
22. G. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. phys. Chem. 7. S. 179 u. 425. 1882/83.
23. Ortweiler, Physiol. u. pathol. Bedeutung des Harnindicans. Mittheilungen a. d. med. Klin. z. Würzb. II. 1886. S. 167.
24. Schunk, Ueber die Farb- und Extractivstoffe des Harns. Journ. f. pr. Chem. 1866. S. 97. Proc. of the roy. Soc. 15. N. 80. p. 1.
25. Leube, Ueber einen neuen patholog. Harnfarbstoff. Dieses Archiv Bd. 106. S. 418. 1886.
26. Chiari, Prag. med. Woch. 50. S. 541. 1888.
27. Ord, Berl. klin. Woch. 1878. S. 365.
28. Kahler, Ein Fall von Indigurin. Prag. med. Woch. 1888. No. 50. S. 544.
29. Krukenberg, Würzb. physik.-med. Verhandl. 1884. S. 192.
30. Thudichum, On cholera chemically investigated. London 1867.
31. Wyss, Ueber die Beschaffenheit des Harns im Reactionsstadium der Cholera. Arch. f. Heilk. 9. S. 237. 1868.
32. Heller, Vom Urophaein. Heller's Archiv. (Neue Folge.) I. 1852. S. 3.
33. Plósz, Ueber einen neuen krystallin. farbigen Harnbestandtheil. Zeitschrift f. phys. Chem. VI. S. 504. 1882.
34. Plósz, Ueber einige Chromogene des Harns und deren Derivate. Zeitschrift f. phys. Chem. Bd. VIII. 1883/84. S. 85.
35. v. Udránszky, Ueber die Beziehung einiger in dem Harn bereits vorgebildeter oder daraus durch einfache Proceduren darstellbarer Farbstoffe zu den Huminsubstanzen. Zeitschr. f. phys. Chem. 1887. Bd. 11. S. 537 u. 1888. Bd. 12. S. 33.
36. L. Brieger, Weitere Beiträge zur Kenntniss des Skatol. Zeitschr. f. phys. Chem. IV. S. 414.
37. Nencki und Sieber, Ueber das Urorosein. Journ. f. pr. Chem. 1882. 26. S. 333.
38. J. Otto, Ueber das Vorkommen grösserer Mengen von Indoxyl- und Skatoxylschwefelsäure im Harn bei Diabetes mellitus. Pflüger's Arch. Bd. 33. S. 559.
39. Mester, Ueber Skatoxylschwefelsäure und Skatolfarbstoff. Zeitschr. f. phys. Chem. 12. S. 30. 1888.
40. Mester u. Rumpel, Jahrbücher der Hamburgischen Staatskrankenanstalten. Jahrg. 1889. S. 36.
41. Harley, Verh. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg. 1854. V. S. 1.
42. Giacosa, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 20. 1887. S. 393 (Ref.).
43. Ewald, Die pathogenetische Bedeutung der Rosenbach'schen Reaction. Berl. klin. Wochenschr. 1889. No. 44.