

Kurzer Gang zum Nachweis von Blut im Harne und Wahl der Methode.

1. Man läßt eine größere Menge Harn, dessen Reaktion man sogleich bestimmt, in einem cylinderförmigen Glase mehrere Stunden stehen, gießt die klare Flüssigkeit ab und untersucht den etwa vorhandenen Bodensatz, den man seiner Menge und seinem Aussehen nach erst makroskopisch genau betrachtet, mit dem Mikroskope auf die Anwesenheit von Blutkörperchen, Blutcyclindern, Epithelien (ob Nieren, Blasenepithelien), krystallinischen Salzen, Kalkoxalat; letzteres könnte auf das Vorhandensein von Steinen hinweisen. Durch eine mikroskopische Prüfung erfährt man, ob Hämaturie oder Hämoglobinurie vorliegt.

2. Man stellt weiter als Vorprobe die Hellersche Probe (Nr. 2), dann die einfach, leicht und schnell ausführbare Guajacprobe, die Probe mit dem Ätherextrakt, die Benzidinprobe, die Teichmannsche Hämprobe an.

3. Es erfolgt dann die spektroskopische Prüfung, besonders wenn die vorerwähnten Proben keine positiven Resultate gaben und der Befund auf eine Hämoglobinurie hinweist.

Für eine exakte Blutprobe bei der Hämaturie stellt man, wie S. 465 beschrieben, einen Ätherextrakt her; davon prüft man einige Kubikzentimeter mit dem Guajac- und Benzidinreagens, die Hauptmenge verwendet man nach Ammoniakzusatz usw. zur spektroskopischen Prüfung (S. 474). Mit diesem kombinierten Verfahren lassen sich sehr kleine Blutmengen nachweisen.

4. Man hat gewöhnlich auch noch eine Eiweißbestimmung vorzunehmen, um sagen zu können, ob der Gehalt an Eiweiß dem Blutgehalte entsprechen könnte. Dies ist in gewissen Fällen (Ort der Blutung und dergl.) von wesentlicher Bedeutung.

36. Die Harnfarbstoffe.

Daß der normale mehr oder weniger gelb gefärbte Harn mehr als einen Farbstoff enthält, ist wohl besonders auf Grund der spektrophotometrischen Untersuchungen von K. Vierordt als sicher anzunehmen, wenn auch diese Farbstoffe noch nicht alle eliminiert und charakterisiert oder gar bestimmt werden konnten. Außer den fertigen Farbstoffen (den präformierten) enthält der Harn noch eine Reihe sogenannter Chromogene, Farbstoffbildner, die erst bei der Einwirkung der Luft, durch Oxydation, Farbstoffe erzeugen. Die Harnfarbstoffe entstehen aus Umwandlungsprodukten des Blutes.

Am zweckmäßigsten wird man die Farbstoffe einteilen in solche, die im normalen Harne (in vermehrter Menge dann in pathologischen Harnen), in solche, die ausschließlich im pathologischen Harne vorkommen und in solche, die durch verschiedene Stoffe, Arzneien, gebildet werden.

I. Im normalen Harne vorkommende Farbstoffe.

Normaler Harn zeigt keine Absorptionsbänder, er absorbiert nur das Licht in verschiedenen Regionen des Spektrums mit ungleicher Stärke, und zwar wächst diese Absorption des Lichtes in der Richtung von Rot gegen Violett; doch kommen bei verschiedenen Harnen erhebliche Schwankungen vor. Der Farbstoff des normalen Harnes läßt sich durch Bleiacetat, durch Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure, wenn auch nicht vollständig, fällen und durch Tierkohle mehr oder weniger vollständig ausfärben.

Im frischen Harne kommen stets vor das Urochrom und in sehr kleinen Mengen das Hämatoporphyrin, häufig das Uroerythrin, auch das Urobilin in gestandenem Harn, aus seinem Chromogen, dem Urobilinogen hervorgegangen.

A. Urochrom.

Als eigentlichen Farbstoff des Harnes hätten wir nach den Untersuchungen von A. E. Garrod¹⁾ das Urochrom zu betrachten, das die Hauptmenge des Farbstoffes in normalen Harnen ausmacht, dem Harn die gelbe Farbe erteilt und das in dem gefärbten Sedimente neben Uroerythrin stets vorhanden zu sein pflegt.

Nach M. Weiss²⁾ besteht das Urochrom im alten Sinne als normaler gelber Harnfarbstoff nicht. An der Harnfarbe sind vielmehr verschiedene endogene und wahrscheinlich auch exogene Farbstoffe und Chromogene beteiligt.

Die normale Harnfarbe entspricht nach Klemperer³⁾ einem Gehalte von ungefähr 0,15% Urochrom. J. Browiński und St. Dombrowski fanden im Harn gesunder Menschen 0,5 g für den Tag, J. Marischler fand im Harn 0,168, 0,21—0,31, 0,37—0,86 g. Stark gesteigert war der Gehalt, und zwar von 0,8—1,4 g für den Tag, in einem Falle von Diabetes insipidus. Die angegebenen Werte können nur als annähernde angesehen werden, da wir ja gar kein Verfahren haben, den Farbstoff in erster Linie als reinen Körper und dann auch vollständig aus dem Harn zu gewinnen.

Nach Garrods Ansicht steht das Urochrom in naher Beziehung zum Urobilin und damit zu den Gallenfarbstoffen bzw. dem Hämatin; nach Dombrowski⁴⁾ besteht aber eine solche Beziehung nicht, er ist, wie auch schon früher J. L. W. Thudichum, der Anschauung, daß das Urochrom ein Produkt des Eiweißabbaues ist, ebenso wie die Proteinsäuren. Nach St. Dombrowski gehört das Urochrom zu den Oxyproteinsäuren und stellt die schwefelreichste Verbindung unter diesen dar; der Schwefelgehalt betrug bis 5%; dieser ist im Urochrom teilweise in lockerer Bindung enthalten und wird leicht abgespalten. Aber auch gegen die Reinheit des Urochroms von Dombrowski wurden von H. Liebermann⁵⁾, H. Hohlweg⁶⁾, M. Weiss⁷⁾ Bedenken geäußert. Wahrscheinlich stellt das Urochrom ein unvollständiges Oxydationsprodukt des Eiweißes, ein intermediäres, dem Gewebszerfalle entstammendes Stoffwechselprodukt, dar.

Wegen der Zusammensetzung und der Eigenschaften herrschen noch keine übereinstimmenden Meinungen, da nach den verschiedenen Herstellungsverfahren keine einheitlichen Körper gewonnen wurden.

Wir kennen — nach den Herstellern — etwa 5 Urochrome; alle von verschiedener Beschaffenheit.

Nach M. Weiss ist der normale Harnfarbstoff hervorgegangen aus einem Urochromogen, das in seinen Fällungsreaktionen mit den Proteinsäuren

¹⁾ *Proc. of the Roy. Soc.* 1894. **55**, 394; *Journ. of Physiol.* 1897. **21**, 190; 1903. **29**, 335.

²⁾ *Biochem. Zeitschr.* 1922. **133**, 331; **134**, 269, 567.

³⁾ *Berlin. klin. Wochenschr.* 1903. **40**, 314.

⁴⁾ *Zeitschr. physiol. Chem.* 1909. **62**, 358.

⁵⁾ *Zeitschr. physiol. Chem.* 1907. **52**, 129.

⁶⁾ *Biochem. Zeitschr.* 1908. **13**, 199.

⁷⁾ *Biochem. Zeitschr.* 1911. **33**, 333; 1920. **102**, 228; 1921. **112**, 61.

übereinstimmt und nur im pathologischen Harn vorkommen soll. Es wäre anzunehmen, daß unter normalen Verhältnissen als intermediäres Stoffwechselprodukt Urochrom, bei gestörtem Stoffwechsel aber Urochromogen gebildet wird. Dieses Urochromogen, das als Phenylaminderivat betrachtet und das sehr leicht oxydiert wird, ist nach Weiss der eigentliche Träger der Ehrlichschen Diazoreaktion; es werden 2 Urochromogene unterschieden; das Urochrom β gibt die Reaktion ohne weiteres. Das Urochrom α gibt sie erst nach dem Stehen im Brutschranke. Beide Chromogene können durch Oxydation, z. B. mit Kaliumpermanganat in das echte Urochrom übergeführt werden, das keine Diazoreaktion gibt; mit der Überführung des Chromogens β in Urochrom verschwindet die positive Diazoreaktion in Diazoharnen. Die Antoxyproteinsäure von Bondzynski, Dombrowski und Panek ist dann nach Weiss ein Gemisch von dieser Säure und von den genannten Urochromogenen, von denen das eine die Diazoreaktion auslöst.

Siehe die Übersicht von Weiss über den Zusammenhang des echten Urochroms mit den Proteinsäuren S. 245.

Darstellung.

Die Darstellung, bei der nur ein geringer Teil gewonnen wird, beruht darauf, daß durch Ammoniumsulfat, mit dem der Harn gesättigt wird, Urobilin, Hämatoporphyrin, Uroerythrin ausgefällt werden; das Urochrom wird aber zum größten Teil in Lösung gehalten und kann durch absoluten Alkohol (20–30 ccm zu 100 ccm gesättigten Harnes) entzogen werden.

Die alkoholische Lösung wird zur Reinigung in viel Wasser gegossen, mit Ammoniumsulfat gesättigt und die wieder abgeschiedene alkoholische Farbstofflösung mit festem Ammoniumsulfat unter schwachem Erwärmen entwässert, worauf man sie nach Zusatz von etwas Ammoniak (die Lösung muß alkalisch bleiben) auf dem Wasserbade erwärmt und schließlich zur Trockene eindampft. Der Rückstand wird zur Entfernung von Indoxylschwefelsäure mit Essigäther gewaschen, mit absolutem Alkohol behandelt und die alkoholische Lösung in ein gleiches Volumen Äther gegossen. Der amorph ausgefallene Farbstoff wird mit Äther gewaschen, der trockene Filterrückstand mit Chloroform, dann mit absolutem Alkohol behandelt und der zurückgebliebene Farbstoff in Wasser gelöst. (Garrods Verfahren.)

Bestimmung.

Eine annähernd quantitative Bestimmung hat F. Klemperer angegeben, und zwar colorimetrisch unter Verwendung einer Lösung von Echtgelb G als Vergleichsflüssigkeit, die derart hergestellt wird, daß 0,001 g in 180 ccm Wasser gelöst werden. Die Farbenstärke dieser Lösung entspricht der einer 0,1%igen Urochromlösung. Durch entsprechende Verdünnung des Harnes oder der Farbstofflösung und Beobachtung in den gleichen Gefäßen, am besten mit dem Colorimeter, könnte man den Urochromgehalt annähernd bestimmen.

J. Marischler¹⁾ verfährt unter Zugrundelegen der von J. Browiński und St. Dombrowski²⁾ angegebenen Methode in folgender Weise: 200 ccm Harn werden mit 60 g Chlorammonium und nach dem Filtrieren von der ausgeschiedenen Harnsäure mit 5 ccm einer 5%igen Lösung von Jodsäure versetzt; das abgeschiedene Jod wird in einem Scheidetrichter mit Schwefelkohlenstoff ausgezogen und in dieser Lösung mit einer $\frac{1}{100}$ n-Lösung von Natriumthiosulfat titriert, worauf durch Multiplikation der gefundenen Jodmenge mit dem Faktor 0,8452 der Stickstoff des Urochroms und mit diesem auch das Urochrom selbst berechnet wird; reines Urochrom enthielt im Mittel 11,15% Stickstoff, so daß 1 g Jod 7,580 g Urochrom und 0,8452 g Urochromstickstoff entspricht. Browiński und Dombrowski hatten den Harnfarbstoff aus 800—1000 ccm Harn mit Kupferacetat gefällt, nachdem vorher die Harnsäure neben Schwefelsäure und Phosphorsäure durch Fällen mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium- und Calciumacetat beseitigt worden war. Der Kupferniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff bei 50° zerlegt und letzterer im Vakuum mit Kohlensäure entfernt. 150—200 ccm der Lösung wurden mit einer 5%igen Lösung von Jodsäure bis zur Blaufärbung von mit Kongorot gefärbten Papierstreifen versetzt und dann mit Schwefelkohlenstoff umgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschene, nicht mehr saure Schwefelkohlenstofflösung wurde mit $\frac{1}{10}$ -Thiosulfatlösung titriert. Reines Urochrom und zwar 0,2049 g entbinden 0,02703 g Jod aus der Jodsäure. Weitere Berechnung wie oben angegeben.

Beurteilung.

Eine halbwegs sichere Bestimmung ist wegen der im Harn vorhandenen anderweitigen Farbstoffe, deren Zusammensetzung und chemische Natur wir gar nicht kennen, natürlich nicht zu erwarten.

Kolorimetrische Bestimmung des Urochromogens und Urochroms nach M. Weiss.

Erforderliche Lösung.

Als Vergleichsfarbe wurde eine Lösung von Echtgelb (Müller, Leipzig) verwendet. 1 g Echtgelb wird in 500 ccm dest. Wassers gelöst. Von dieser dunkelorange gefärbten Lösung werden 10 ccm auf 100 ccm und dann wieder 20 ccm auf 800 ccm mit Wasser verdünnt. Diese letzte Lösung zeigt eine hellgelbe Farbe mit grünlichem Stiche, wie sie den Urochromlösungen eigen ist. Die Vergleichslösung enthält demnach 0,1 g Echtgelb auf 20 Liter Wasser. Die in 100 ccm dieser Farbstofflösung enthaltene Farbstoffmenge wurde = 100 gesetzt.

Ausführung der Bestimmung.

Zu 250 ccm Harn werden 20 g fein gepulvertes Ammoniumsulfat zugesetzt; unter häufigem Umrühren mit einem Glasstabe wird der größte Teil des Salzes in Lösung gebracht. Nach etwa $\frac{1}{2}$ -stündigem Stehen haben sich dem Urochrom beigemengte andere Farbstoffe (Urobilin, Urobilinogen, Hämatoporphyrin, Uroerythrin) abgeschieden. Nun wird mit einer heiß gesättigten Ammoniumsulfatlösung auf 500 ccm aufgefüllt. Nach dem Filtrieren sind früher sehr verschieden gefärbte Harnen wohl untereinander vergleichbar geworden. Von diesem Filtrate werden 10 ccm in einem Dubosq'schen Kolorimeter mit 10 ccm obiger Echtgelbfärbung verglichen.

Zur Bestimmung des Urochromogens wird eine zweite Probe des Harnes (25 ccm) unter öfterem Umschütteln tropfenweise mit einer 1%igen Permanganatlösung solange versetzt, als noch eine deutliche Zunahme der Gelbfärbung zu sehen ist, erkenntlich an der oberen Grenze der Flüssigkeit; man braucht etwa 20—30 Tropfen; ein Überschuß ist zu vermeiden, da der Harn sonst einen störenden Stich ins Bräunliche erhält. Man kann auch solange die Permanganatlösung hinzugeben, bis die Diazoreaktion nicht mehr eintritt und anzeigt, daß das Urochromogen verschwunden ist. Nach beendeter Oxydation wird ebenso verfahren, wie mit dem ursprünglichen Harn. Die Differenz zwischen dem Urochromgehalt des nicht oxydierten und des oxydierten Harnes ergibt die Menge des Urochromogens. Nach Weiss ist diese Differenz ein direktes Maß für die Ehrlich'sche Diazoreaktion.

Beispiel: Bei einer Tagesmenge von 900 ccm Harn habe sich ergeben, daß das Verhältnis von Echtgelblösung zu dem auf das zweifache verdünnten Harnfiltrat = 20:22 ist, dann ist dieses Verhältnis zunächst wegen der Verdünnung des Harnes zu verdoppeln auf 40:22 und es ergeben sich demnach $\frac{40 \cdot 900}{22} = 1636$ Einheiten Echtgelb.

Eigenschaften.

Das in Wasser und in gewöhnlichem Alkohol leicht lösliche Urochrom oder das Farbstoffgemisch, wie man es bisher gewonnen hat, ist gelb bis braun, amorph. In Äther, Chloroform und Benzol ist es unlöslich, in Essigäther, Amylalkohol, Aceton ist es nur wenig löslich. Seine Lösung zeigt

¹⁾ Tygodnik lekarski 1909. 4. 457; Jahresber. Fortschr. d. Tierchem. 1910. 39. 321.

²⁾ Jahresber. Fortschr. d. Tierchem. 1909. 38. 353.

spektroskopisch weder Absorption noch Fluoreszenz. Die wässrige Lösung ist nicht sehr lichtbeständig, leicht zersetzlich. Durch Bleiacetat, Silbernitrat, Mercuriacetat, Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure wird es gefällt. Durch Säuren zersetzt es sich leicht unter Bildung von braunen oder schwarzen Farbstoffen (Uromelanin); mit Aldehyd entsteht ein dem Urobilin ähnlicher fluoreszierender Farbstoff. Diese Reaktion wird nach Dombrowski aber durch eine Verunreinigung bedingt; er erhielt mit dem von ihm gewonnenen Urochrom diese Reaktion nicht.

Nach Klemperer enthält das Urochrom 4,2% Stickstoff, nach Dombrowski etwa 11%, nach Hohlweg etwa 10%, nach Dombrowski ungefähr 5% Schwefel, das von Hohlweg-Salomonsen¹⁾ hergestellt Urochrom ist wieder schwefelfrei.

Die Entstehung brauner oder schwarzer Farbstoffe aus dem Harn durch Einwirkung von Säuren ist schon von Udránszky nachgewiesen worden und findet nun zum Teil ihre Erklärung; sie sind aus dem Urochrom hervorgegangen; ein weiterer Teil dieser Farbstoffe rührt aber, wie der genannte Forscher angegeben hat, auch von der Einwirkung der Säuren auf die Kohlenhydrate unter Bildung von Huminsubstanzen her. Die von Udránszky gewonnenen Huminsubstanzen bildeten spröde, glänzende, schwarzbraune Blättchen, unlöslich in Wasser, in Alkohol, Äther und in Chloroform, leicht löslich in Amylalkohol, in konzentriertem Ammoniak, sehr leicht löslich in Kali- und Natronlauge. (Uromelanin.)

Nach St. Dombrowski²⁾ wird das Uromelanin, eine Substanz, die 1,63% Schwefel enthält, aus dem Urochrom durch Säurehydrolyse erhalten, und zwar von konstanter Zusammensetzung; es zeigt eine auffallende Ähnlichkeit in der Zusammensetzung mit dem Proteinochromogen, das von Nencki als Muttersubstanz der schwarzen tierischen Pigmente betrachtet wurde.

B. Uroerythrin (Purpurin).

Mit diesem Namen bezeichnet man den Farbstoff, der die ziegelrote, auch rosafarbene Beschaffenheit der Uratsedimente, des Sedimentum lateritium, des Ziegelmehlsedimentes bedingt; er tritt im Harn, reichlicher nach starkem Genusse von Speisen und besonders von Alkohol, nach starker Muskeltätigkeit, nach starken Schweißen, aber auch im pathologischen Harn bei Digestionsstörungen, bei Rheumatismus, bei Gicht, bei Malaria, bei Influenza, bei Erkrankungen der Leber, bei Fieberkrankheiten auf.

Darstellung.

Man verfährt am besten nach A. E. Garrod³⁾ und verwendet das Sediment, da dieses weniger mit Hämatoporphyrin verunreinigt ist.

Das beim Stehen des Harnes abgeschiedene Uratsediment sammelt man auf einem Filter, löst es dann nötigenfalls unter Erwärmen in etwas Wasser

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1908. 13. 205.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1908. 54. 227; 1909. 62. 358.

³⁾ Journ. of Physiolog. 1895. 17. 439.

und fällt aus der Lösung den Farbstoff durch Chlorammonium aus; das abgeschiedene Uroerythrin wird wiederholt mit Chlorammoniumlösung zur Entfernung des Urobilins ausgewaschen, bis das Filtrat nicht mehr gefärbt ist. Filter und Niederschlag bringt man in warmen Alkohol und digeriert einige Stunden im Dunkeln, filtriert, verdünnt die Alkohollösung mit dem doppelten Volumen Wassers und schüttelt zur Entfernung des Hämatoporphyrins mehrere Male mit Chloroform aus. Nun setzt man der Farbstofflösung einige Tropfen Essigsäure zu und schüttelt abermals mit Chloroform, das das Uroerythrin aufnimmt. Die mit Wasser gewaschene Chloroformlösung läßt man im Dunkeln verdunsten.

Auch durch Schütteln des Harnes mit Amylalkohol wird der Farbstoff leicht gelöst, der Amylalkohol färbt sich orangerot oder rosa.

Nachweis.

1. Ein an diesem Farbstoffe reicher Harn zeigt meist eine auffallende matt orangerote Färbung. Mit Kalkmilch wird der Farbstoff blaugrün.
2. Eine verdünnte alkoholische Lösung des isolierten Farbstoffes, auch die mit Amylalkohol, zeigt ein sehr charakteristisches Spektrum, ein Doppelband zwischen *D* und *E* bis *F* reichend, durch Schatten verbunden; eine konzentrierte Lösung absorbiert das ganze brechbare Ende des Spektrums. Die Lösungen fluorescieren nach Zusatz von ammoniakalischer Zinklösung nicht, wie Urobilin.

Kennzeichnend ist, daß die Lösung bei Lichteinwirkung bald verblaßt, und daß auch der Streifen bei *D* und *F* leicht verschwindet.

3. Konzentrierte Schwefelsäure bewirkt (bei dem rein hergestellten Farbstoffe) karminrote, Alkalien (nicht Ammoniak) verursachen eine grüne (zuerst purpurne bis blaue) Färbung.

Eigenschaften.

Das isolierte Uroerythrin ist amorph, rosa (krebsrot) gefärbt, leicht in Amylalkohol und in verdünntem Alkohol, auch in Essigäther, schwer in Wasser löslich, Spuren von Säuren erhöhen die Löslichkeit. Mit Alkalilaugen, auch Kalkmilch, wird es grün, durch konz. Schwefelsäure karminrot gefärbt; dabei wird es zersetzt. Die Lösungen werden im Lichte bald gebleicht — eine besonders auffallende Eigenschaft des Farbstoffes — und zeigen die beim Nachweise angegebenen weiteren Eigenschaften.

Die chemische Natur des Uroerythrins ist noch unbekannt.

C. Urospektrin.

Für den eigentlichen Harnfarbstoff hält Sallet¹⁾ das Urospektrin. Genauer ist jedoch über diesen Farbstoff nicht bekannt. Er scheint das Hämatoporphyrin zu sein.

¹⁾ Rev. de med. 1896. 16. Nr. 7.

D. Urobilin und Urobilinogen.

Das Urobilin, ein Derivat des Hämoglobins, von M. Jaffé zuerst aus dem Harn dargestellt, ist nach Sallet¹⁾, L. Grimbert²⁾ im eben entleerten normalen und vor Licht geschützten Harn eigentlich nicht vorhanden, sondern entsteht erst unter der Einwirkung des Lichtes und des Luftsauerstoffes (beim Schütteln) aus dem Chromogen, dem Urobilinogen. In pathologischen Fällen kann das Urobilin präformiert vorkommen. Nach H. Strauss und L. Hahn³⁾ sind Urobilinogen und Urobilin normale Harnbestandteile. Die gelbe Harnfarbe ist nicht, wie manchmal angenommen wird, durch diesen Farbstoff, sondern durch das Urochrom bedingt. Doch siehe dort. Spuren des gebildeten Urobilins (0,02—0,08 g in der Tagesmenge, nach Serkowski 0,08—0,20 g normales Vorkommen) können im normalen Harn wohl vorhanden sein. Vermehrt ist das Urobilin bei allen Krankheiten, durch die ein Zerfall der roten Blutkörperchen veranlaßt wird, bei denen viel Blut zugrunde geht, bei inneren Blutungen (der Blutfarbstoff wird zunächst in Bilirubin oder Hämatoidin verwandelt und dann als Urobilin ausgeschieden), bei Einwirkung blutzerstörender Gifte, bei allen akuten fieberhaften Erkrankungen (Typhus, Paratyphus, Fleisch- und Wurstvergiftung), bei Infektionskrankheiten, bei Pyämie, Pneumonie, Skorbut, Malaria, bei Scharlach (im Gegensatze zu Diphtherie), ferner bei vermehrter Darmfäulnis, bei Gallenstauungen, bei Lebererkrankungen, bei Bleikolik, bei Krebs, bei Herzfehlern, bei dem sogenannten Urobilinikterus. Bei Morbus Basedowii kommt Urobilin beinahe immer vor. Nach dem Gebrauche von Antifebrin, Antipyrin, Pyrocin erscheint auch ein Überschuß von Urobilin im Harn. Urobilinhaltige Harn zeigen meist einen Stich ins Bräunlich-rötliche, doch kann nach A. Kirch bei Nierenerkrankungen auch ein lichter Urin reichlich Urobilinogen enthalten. Über die Entstehung und Bildung des Urobilins sind verschiedene Theorien aufgestellt worden, ohne daß mit aller Sicherheit die Frage einer endgültigen Lösung zugeführt worden ist. Jedenfalls ist soviel sicher, daß die Bildung aus dem Blute und aus den Gallenfarbstoffen durch Bakterieneinwirkung auf das Bilirubin im Darne erfolgt; die Leber reguliert die Urobilinausscheidung (F. Müller); hiefür spricht die Tatsache, daß das Urobilin beim Beginne oder beim Ausgange von Ikterus wesentlich vermehrt ist und daß Harn, der ikterisch gefärbt ist und der die sonstigen äußeren Merkmale eines ikterischen Harnes (gelben Schaum usw.) zeigt, nur Urobilin enthalten kann.

Das wichtigste physiologische Abbauprodukt des Blutes ist der in der Leber bereitete Gallenfarbstoff; das Bilirubin der Galle wird im Darne (vorwiegend im Dickdarne) durch einen Reduktionsprozeß infolge des Zusammenwirkens der Darmbakterien mit der Schleimhaut zu Urobilinogen umgewandelt.

¹⁾ Rev. de med. 1897. 17. 114.

²⁾ Compt. rend. 1911. 152. 727.

³⁾ Zentralbl. inn. Mediz. 1920. 41. 193.

Ein Teil des im Darne gebildeten Urobilinogens wird mit der Faeces ausgeschieden, ein anderer Teil wird resorbiert, durch den Blutkreislauf der Leber zugeführt, wieder in Bilirubin umgewandelt, gelangt in die Galle und mit dieser in Darm zurück. Ein geringer Teil wird aber auch vom Blute resorbiert, ohne die Leber zu passieren; dieser geht in den Harn über (normale Menge).

Sichergestellt ist, daß die Leber bei der Verarbeitung des Urobilins beteiligt ist, denn nach F. Fischlers¹⁾, Tefiks und Ibrahims²⁾ Versuchen ist die Urobilinurie die Folge einer gewissen Insuffizienz der Lebertätigkeit, die sich darin äußert, daß sie den normalen Urobilinstrom vom Darm aus nicht mehr bewältigen kann oder bei schwerer Erkrankung sogar das ihr normal zuströmende Bildungsmaterial der Galle nicht mehr richtig verarbeitet. Nach W. Hildebrandt kommt Urobilinurie bei gesunder Leber zustande infolge erhöhten Blutzerfalls (relative Insuffizienz der Leber); bei nicht erhöhtem Blutzerfalle läßt Urobilinurie stets auf eine Erkrankung des Leberparenchyms oder auf lokale Gallenstauung schließen (absolute Insuffizienz der Leber).

Diese sog. intestinale Theorie (Verwandlung des Bilirubins der Galle im Darne durch die Bakterien zu Urobilin, enterogener Entstehungsmodus) hat wohl die größte Wahrscheinlichkeit für ihre Richtigkeit für sich. Die nephrogene, nach der die Nieren die Fähigkeit besitzen sollen, durch die Blutbahn zu den Nieren gelangende Farbstoffe (Gallenfarbstoff) in Urobilin überzuführen, die histogene Theorie, nach der das Bilirubin in den Geweben als Schutzmaßregel gegen eine Giftwirkung in Urobilin umgewandelt wird, erscheinen wenig begründet. Für die Richtigkeit der hepatogenen Theorie, nach der die normale Leberzelle Bilirubin, die kranke Urobilin erzeugen soll, ergab sich noch kein ganz einwandfreier Beweis. Nach der hämatogenen Theorie hat die Leberzelle mit der Urobilinbildung nichts zu tun. Die Bildung soll von der Zerstörung der roten Blutkörperchen (Erythrocytolyse) abhängig sein; man begründete diese Theorie damit, daß man in hämorrhagischen Ergüssen Bilirubin findet. Hildebrandt leugnet eine hepatogene, wie hämatogene Entstehung des Urobilins. O. v. Fürth (a. a. O.) hält die Urobilinurie, die nach toxischem Blutkörperchenzerfalle oft zur Beobachtung gelangt, wie den zugehörigen Ikterus im allgemeinen nicht für „hämatogen“. Der Vorgang ist vielmehr einfach der, daß aus den zerfallenden Erythrocyten viel Gallenfarbstoff in der Leber bereitet wird und dieser nun seinerseits den Darmbakterien reichliches Material zur Urobilinbereitung liefert.

Th. Brugsch und K. Retzlaff³⁾ weisen darauf hin, daß in der Urobilinurie der klinische Ausdruck für die Ausscheidung einer Reihe Körper, die zum Blutfarbstoffe, wie zum Gallenfarbstoffe Beziehung haben, zu erblicken ist. Die Urobilinurie hat ihre Ursache in der Regel in einer Leberinsuffizienz.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1906. 48. 419.

²⁾ Zeitschr. Urolog. 1909. 3. 703.

³⁾ Zeitschr. exp. Patholog. Therap. 1912. 11. 508.

Voraussetzung für die Möglichkeit der Urobilinurie ist das Hereingelangen von Gallenfarbstoffen in den Darm, Reduktion dieser zu Urobilinogen, Resorption, Prozesse, wie sie in einem bei Lebererkrankungen häufig geschaffenen Bakterienmilieu des Darmes begünstigt werden. Die hepatische Insuffizienz äußert sich in einer Unfähigkeit, das zugeführte Urobilin in Gallenfarbstoff zu verwandeln, so daß es in das Blut passieren kann. Von dem ins Blut gelangten Urobilin wird ein Teil durch die Niere ausgeschieden.

Das Vorkommen größerer oder geringerer Urobilinemengen im Harn ist von wesentlicher diagnostischer Bedeutung, es zeigt uns starke Darmfäulnis und einen stärkeren Zerfall von Blutkörperchen an, es kann keine Blutung irgendwie im Organismus gewesen sein, wenn es kein Urobilin im Harn gibt. Jedenfalls muß bei einer Harnuntersuchung auch an die Prüfung auf Urobilin gedacht werden; man bestimmt dann zweckmäßig die Menge annähernd. Denn nach Hildebrandt sind Lebererkrankungen in unserem Klima häufig; die Leber wird bei Infektionskrankheiten, Kreislaufstörungen usw. weit häufiger in Mitleidenschaft gezogen, als beispielsweise die Nieren. Urobilinurie kommt häufiger vor, wie Albuminurie; eine rechtzeitige Untersuchung des Harnes wird uns auch feine Veränderungen im Leberparenchym, also Anfangsstadien, erkennen lassen, die bei dem Unterlassen der Prüfung des Harnes auf Urobilin außerdem übersehen werden können. Auch F. A. Steensma bemerkt, Urobilinurie ist analog der Albuminurie; wie letztere den Verdacht auf die Nieren lenkt, so legt Urobilinurie die Möglichkeit einer Leberaffektion nahe, denn eine wichtige Leberfunktion besteht in der Umwandlung des Urobilins; bei der Urobilinurie ist diese gestört.

Darstellung und quantitative Bestimmung.

1. Man gewinnt das Urobilin aus dem Harn gewöhnlich nach dem von Méhu und Hoppe-Seyler¹⁾ angegebenen Verfahren.

100—500 ccm Harn werden je nach der Menge des vorhandenen Urobilins mit 0,2—1 g Schwefelsäure angesäuert und mit Ammoniumsulfat (auf 100 ccm Harn 80 g) gesättigt; es wird nach mehrstündigem Stehen filtriert, das auf einem Filter (Asbestfilter) gesammelte, in roten Flocken abgeschiedene Urobilin mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und dann zweimal mit einer aus gleichen Teilen Alkohol und Chloroform hergestellten Mischung extrahiert. Die in einen Scheidetrichter durch ein Asbestfilterchen filtrierte Farbstofflösung wird mit dem doppelten Volumen Wassers geschüttelt und gewaschen, das klar abgesetzte und aus dem Scheidetrichter abgelassene Chloroform nochmals mit Wasser im Scheidetrichter behandelt und die filtrierte Chloroformfarbstofflösung vorsichtig verdunstet. Die konzentrierte Chloroformlösung fällt man mit Äther, sammelt das ausgeschiedene Urobilin auf einem Asbestfilterchen, löst den Farbstoff wieder in Chloroform und verdunstet in einem vorher gewogenen Glasschälchen oder Kölbchen bei mäßiger Wärme — am besten aber bei gewöhnlicher Temperatur — das Chloroform,

¹⁾ Virchows Archiv 1891. 124. 34.

worauf man nach mehrstündigem Stehen des Schälchens über Schwefelsäure im Exsiccator den Farbstoff wägt.

Beurteilung.

Nach Versuchen von F. Müller und Huppert unterläßt man besser das Ansäuern mit Schwefelsäure, um nicht das Urochrom zu zersetzen; weiter entfernt man zweckmäßig zuerst die Harnsäure, das Hämatoporphyrin, sowie Gallenfarbstoffe ähnlich der Huppertschen Probe beim Gallenfarbstoffnachweise.

Der Harn (100–200 ccm) wird mit alkalischer Chlorbariumlösung (auf 100 Teile Harn 30 Teile einer Mischung von 1 Vol. gesättigter Bariumchloridlösung und 2 Vol. gesättigten Barytwassers) versetzt, filtriert, zum Filtrate konzentrierte Natriumsulfatlösung zur Entfernung des im Überschuße vorhandenen Baryts zugesetzt, mit Schwefelsäure nahezu neutralisiert und das Filtrat mit Ammoniumsulfat gesättigt. Der abfiltrierte, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung einmal behandelte Farbstoffniederschlag wird auf dem lufttrockenen Filter nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure mit einer Mischung von 1 Teil Äther und 2 Teilen Alkohol in der Wärme ausgezogen, die Lösung im Scheidetrichter mit Chloroform und dann mit dem doppelten Volumen Wassers geschüttelt und die Lösung des Urobilins im Chloroform nach dem Absetzen abgelassen. Dieser Lösung, die noch 1–2mal mit Wasser zu waschen ist, wird das Urobilin durch Schütteln mit ammoniakalischem Wasser (ja nicht zu viel Ammoniak) entzogen, wobei auch eine Trennung vom Indigorot erzielt wird, und aus der ammoniakalischen Lösung das Ammoniak vorsichtig verdunstet. Aus der ammoniakalischen Lösung kann das Urobilin durch Zusatz von Säure gefällt und der gefällte Farbstoff in Chloroform gelöst werden. Dieses wird verdunstet. Zu bemerken ist noch, daß das Urobilinogen hierbei ebenfalls gefällt wird; auch sind Verluste an Farbstoff, der besonders im Filtrierpapier — ich nehme deshalb Asbestfilter, den Gooch'schen Tiegel — zurückgehalten wird, nicht zu vermeiden.

2. Darstellung nach M. Jaffé.¹⁾

Der mit Ammoniak schwach alkalisch gemachte Harn wird vom entstandenen Niederschlage abfiltriert und zum Filtrate eine konzentrierte alkoholische oder wässrige Chlorzinklösung zugesetzt. Die bei Urobilin-anwesenheit schön rot oder rotbraun gefärbten Niederschläge werden mit kaltem und dann heißem Wasser ausgewaschen, bis kein Chlor mehr nachweisbar ist und mit Alkohol ausgekocht. Nach dem Trocknen werden die gepulverten Niederschläge in Ammoniak gelöst; diese Lösung wird mit Bleizucker ausgefällt. Den Niederschlag filtriert man ab, wäscht ihn vorsichtig mit Wasser aus, bis sich Farbstoff zu lösen beginnt und digeriert den getrockneten Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Alkohol; diese alkoholische Lösung wird mit dem halben Volumen Chloroform und mit viel Wasser kräftig geschüttelt, die Chloroformlösung mit wenig Wasser gewaschen (es geht leicht Farbstoff ins Wasser!) und das Chloroform abdestilliert. Der Rückstand wird mit Äther gereinigt, der eine Menge fremder Stoffe aufnimmt und Urobilin hinterläßt.

Urobilinarme Harne werden nach Jaffé mit Bleiessig gefällt; der abfiltrierte, ausgewaschene und getrocknete Niederschlag wird mit schwefelsäurehaltigem Alkohol ausgekocht, worauf man die Lösung mit Ammoniak übersättigt und mit Chlorzink versetzt; weitere Behandlung, wie vorstehend angegeben.

Beurteilung.

Man erhält mit diesem Verfahren reine Präparate, erleidet aber Verluste an Farbstoff.

3. Um das fertig gebildete Urobilin neben dem Urobilinogen nachzuweisen, bedient man sich des von Sallet angegebenen Verfahrens.

¹⁾ Virchows Archiv 1869. 47. 405.

100 ccm des frischgelassenen, im Dunkeln verwahrten Harnes werden mit 10 Tropfen Eisesig versetzt und mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt; den abgelassenen Essigäther verwendet man zum Ausschütteln neuer Harnanteile, indem man das fehlende Volumen an Essigäther neu dazugibt. Der Essigäther wird mit wenig Wasser geschüttelt, das vorhandenes Urobilin aufnimmt und sich braun färbt; das Urobilinogen wird durch Stehenlassen der Essigätherlösung im Sonnenlichte in Urobilin übergeführt und diese Lösung ebenfalls wiederholt mit Wasser nach Zusatz von etwas Essigsäure ausgeschüttelt. Das Urobilin kann man durch Chloroform extrahieren oder durch Ammoniumsulfat, wie angegeben, ausfällen.

Beurteilung.

Der Harn darf kein Eiweiß enthalten; beim Ausschütteln des Harnes mit Essigäther hat man unter Ausschluß des Sonnenlichtes zu arbeiten.

4. Nach L. Grimbert¹⁾ kann man das Urobilin von seinem Chromogen in der Weise trennen, daß man die Chloroformlösung der Farbstoffe mit einer gegen Phenolphthalein neutralen Dinatriumphosphatlösung schüttelt; es wird von letzterer nur freies Urobilin aufgenommen; durch stark verdünnte Natronlauge oder durch eine mit einigen Tropfen einer 10%igen Natronlauge versetzten Dinatriumphosphatlösung wird das Urobilinogen von der wässerigen Flüssigkeit aufgenommen, die nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure dieses wieder an das Chloroform abgibt.

5. Darstellung und quantitative Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens nach D. Charnas²⁾ und O. v. Fürth.³⁾

Prinzip.

Der urobilinhaltige Harn wird vergoren, angesäuert und ausgeäthert, die Urobilinogenlösung (durch das Vergären entsteht aus Urobilin Urobilinogen), wenn nötig, durch Petroläther von beigemengtem Farbstoff befreit, durch Belichtung in Urobilin übergeführt und dieses nach weiterer Reinigung durch Aussalzen zur Wägung gebracht.

Ausführung.

500 oder 1000 ccm des urobilinhaltigen, frischen, mit keinem konservierenden Zusatze versehenen Harnes werden bis zum Eintritt alkalischer Reaktion mit Ammoniumcarbonatlösung versetzt und 1—2 Tage lang im Bruttofen belassen. Nunmehr wird der Harn in einem sehr geräumigen, offenen Gefäße durch Zusatz einer gesättigten Weinsäurelösung stark sauer gemacht (Vorsicht, Aufschäumen!), ein etwa ausfallender Niederschlag schnell abgesaugt und die Flüssigkeit mit dem $1\frac{1}{2}$ —2fachen Volumen Äther ausgeschüttelt. Die Ätherschicht wird wiederholt mit einem kleinen Volumen Wassers gewaschen. (Wegen der großen Zersetzlichkeit des Urobilinogens sind die einzelnen Operationen schnell durchzuführen, unnötiges Schütteln ist zu vermeiden, Waschwasser und Weinsäurelösung sollen frisch ausgekocht verwendet werden, die Arbeit ist am besten bei künstlicher Beleuchtung durchzuführen.) Sollte der Äther stark gefärbt erscheinen (Blutgehalt des

¹⁾ Compt. rend. 1911. 152. 727; Chem. Centralbl. 1911. 82. I. 1327.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 1908. 20. 401.

³⁾ Zeitschr. angew. Chemie. 1909. 22. 1931.

Harnes), so wird das gleiche Volumen Petroläther hinzugefügt und der sich abscheidende Farbstoff durch wenig Wasser entfernt. In der nunmehr nahezu farblosen ätherischen Urobilinogenlösung kann das Urobilin spektrophotometrisch oder gewichtsanalytisch bestimmt werden. Ich will nur das letztere Verfahren erwähnen, da dies allgemein vorgenommen werden kann und mir noch genauer erscheint.

Man bringt die ätherische Urobilinogenlösung im Scheidetrichter etwa mit dem gleichen Volumen reinen Wassers zusammen und läßt nun im direkten Sonnenlichte einen Tag lang stehen. Erfahrungsgemäß ist in allen Fällen nach einem Tage im Sonnenlichte alles Urobilinogen in Urobilin umgewandelt, das beim Schütteln von Wasser leicht aufgenommen wird (längeres Stehen an der Sonne führt zur Entfärbung des Urobilins). Die wässrige Urobilinlösung wird filtriert, mit reinstem Ammoniumsulfat in Substanz gesättigt, der Niederschlag auf einem dichten Filter (Schleicher und Schüll hart Nr. 602) gesammelt, lufttrocken mit möglichst wenig absolutem Alkohol extrahiert, die filtrierte alkoholische Lösung in einem gewogenen Schälchen über Phosphor-pentoxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und der trockene Urobilinrückstand zur Wägung gebracht.

Beurteilung.

Man soll gute Resultate erhalten.

Th. Brugsch und K. Retzlaff (a. a. O.) verfahren ähnlich und ziehen den Harn statt mit Äther mit Ligroin aus, bis die Ehrlichsche Reaktion negativ wird. Die ätherische Lösung wird zur spektrophotometrischen oder chromophotometrischen Untersuchung verwendet (2 ccm Lösung + 0,2 ccm einer kaltgesättigten, ätherischen Dimethyl-p-amidobenzaldehydlösung und 3 Tropfen mit Salzsäure gesättigten, absoluten Alkohols).

Nachweis von Urobilinogen.

1. Mit der Ehrlichschen Aldehydreaktion.

Nach Ehrlich färbt sich der Harn bei Anwesenheit von Urobilinogen mit einer Lösung von Dimethylparaminobenzaldehyd (2%ige Lösung in 20%iger Salzsäure, nach anderer Angabe in Normalsalzsäure) leichter oder stärker rot. (Pyrrolreaktion.)

Erhitzt man die Lösung des Urobilinogens in Chloroform mit dem Ehrlichschen Reagens unter Zusatz von Alkohol, so entsteht ebenfalls eine purpurrote Färbung. Im Spektrum bemerkt man Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E*.

D. Charnas verfährt, um die oxydierende Nebenwirkung der Salzsäure auszuschalten, in folgender Weise: 10–20 ccm Harn werden nach dem Ansäuern mit Weinsäure mit 20–30 ccm reinem Äther kräftig geschüttelt. Die mit Wasser nachgewaschene Ätherlösung wird mit einer kleinen Messerspitze Dimethylparamidobenzaldehyd versetzt. Dann werden etwa 5 Tropfen einer rauchenden Salzsäure hinzugegeben oder noch besser eines mit Salzsäuregas gesättigten, absoluten Alkohols, der aber nur etwa 2 Wochen haltbar ist. Nach Zusatz von wenig Wasser entsteht eine prachtvolle, reine, violette Lösung, deren Spektrum einen breiten Streifen zwischen *D* und *E* zeigt.

2. Die eigelbe Diazoreaktion des Harnes (Ehrlich).

Der Harn wird mit einer sauren Lösung von Sulfodiazobenzol versetzt, wodurch eine intensive Orangefärbung eintritt, die nach Zusatz von Ammoniak in Citronengelb umschlägt.

Nur im ganz frischen Harn ist der Nachweis möglich, da Urobilinogen im Lichte sehr schnell in Urobilin übergeht.

Die Ehrlichsche Aldehydreaktion und ihre Bedeutung im Harn besprechen Berghausen¹⁾, Jonass²⁾, H. Scholz³⁾, F. Schilling⁴⁾.

Nachweis des Urobilins.

Das Urobilin läßt sich nur an seinem spektroskopischen Verhalten und durch die Fluoreszenzprobe erkennen; an Urobilin reicher Harn zeigt dunkle, rote, braunrote Färbung. Harn mit geringerem Urobilingehalte besitzt neben der gewöhnlichen Harnfarbe einen Stich ins Bräunlich-rötliche. Solchen Harn prüft man auch auf die Anwesenheit von Leucin und Tyrosin.

1. Man untersucht den filtrierten, nötigenfalls verdünnten (man verdünnt den Harn, wenn der Absorptionsstreifen infolge der Lichtabsorption undeutlich ist) sauren Harn nach Zusatz von etwas Schwefelsäure direkt mit dem Spektroskope; verdünnte saure Lösungen zeigen einen Absorptionsstreifen an der Grenze von Grün und Blau zwischen den Linien *E* und *F*; wird die Lösung alkalisch gemacht (mit Kalilauge), so wird das Absorptionsband wieder schärfer begrenzt und rückt mehr nach Grün nach der Linie *E* zu (Spektraltafel).

Normale Harn geben keine Absorptionsspektren, dagegen solche bei Fieber, bei Leberstörungen, nach Einnehmen von Antifebrin.

Zu berücksichtigen ist, daß Harn manchmal erst nach längerem Stehen und auf Säurezusatz die Absorptionsstreifen erkennen lassen. Deswegen säuert man an; Harn, die noch andere Farbstoffe in reichlicherer Menge enthalten, können nicht direkt verwendet werden. Man hat dann das Urobilin erst zu isolieren. (3—5.)

2. Fluoreszenzprobe.

- a) Man versetzt 10—15 ccm Harn mit einem gleichen Volumen einer vor dem Gebrauche gut durchgeschüttelten alkoholischen 10%igen Zinkacetatlösung und filtriert. Das Filtrat zeigt eine deutliche grüne Fluoreszenz, zumal wenn man das Glas gegen einen dunklen Hintergrund hält. (Schlesinger.)

Beurteilung.

Die Probe ist sehr empfindlich (Klopstock, Kowarsky, Malfatti).

W. Hildebrandt⁵⁾ benützt eine Lösung von 10,0 g Zinkacetat in 100,0 g absol. Alkohol und verfährt in folgender Weise. Es wird ein weites Reagenzglas zu $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ mit gleichen Teilen Harn und Reagens gefüllt und 12—24 Stunden stehen gelassen. Ein vorhandenes Sediment muß durch Schütteln im Harn verteilt werden, da Sedimente, besonders das Sedimentum lateritium, Urobilin mit niederreißen. Die nach dem Absetzen durch Abgießen oder Filtrieren erhaltene Flüssigkeit betrachtet man, indem man von oben durch sie hindurchblickt. Zeigt sich bei der wasserklaren Flüssigkeit keine Fluoreszenz, so ist keine Urobilinurie anzunehmen; ist die Flüssigkeit gelblich oder rosa gefärbt, so ist fast immer eine pathologisch vermehrte Urobilinausscheidung vorhanden; die Fluoreszenz, durch zu saure Reaktion unterdrückt, tritt dann nach einem Ammoniakzusatz und dem Filtrieren deutlich hervor. Starke Fluoreszenz kommt nur bei Urobilinurie vor.

- b) Man versetzt den Harn mit einigen Tropfen (5) 10%iger Chlorzinklösung und fügt Ammoniak hinzu, bis der entstandene

¹⁾ The Journ. of Americ. med. assoc. 1910. 2. 79; Pharm. Centralh. 1911. 52. 382.

²⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1912. 25. Nr. 9; Münch. med. Wochenschr. 1912. 59. 601.

³⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1919. 45. 62.

⁴⁾ Zentralbl. inn. Mediz. 1918. 39. Nr. 1.

⁵⁾ Münch. med. Wochenschr. 1909. 57. 765.

Niederschlag beim Umschütteln sich löst. Die Lösung zeigt schöne grüne Fluoreszenz; besonders hier tritt der Absorptionsstreifen sehr schön auf.

3. Zweckmäßig, zumal bei geringen Urobilinmengen, schüttelt man 50 ccm Harn nach dem Ansäuern mit einigen Tropfen Salzsäure mit 25 ccm Amylalkohol aus und untersucht die Amylalkohollösung direkt spektroskopisch (saures Spektrum) und nach Zusatz einiger Tropfen einer filtrierten Lösung von 1 g Chlorzink in 100 g stark ammoniakalischen Alkohols; sehr schöne grüne Fluoreszenz und Absorptionsstreifen (metallisches Spektrum). (M. Nencki und A. Rotschy.)

Ist eine Emulsion entstanden, so filtriert man durch ein mit Amylalkohol befeuchtetes Filter, man erhält im Filtrate dann die zwei getrennten Schichten.

4. Th. Roman und G. Delluc¹⁾ schütteln 100 ccm Harn nach dem Ansäuern mit 8–10 Tropfen Salzsäure mit 20 ccm Chloroform vorsichtig aus. 2 ccm der nötigenfalls durch ein Asbestfilterchen filtrierten Chloroformlösung werden mit 2 Volumen einer alkoholischen Zinkacetatlösung (1 g Zinkacetat cryst. in 1000 ccm reinsten Alkohols gelöst) überschichtet (Zonenreaktion). Es entsteht an der Berührungsstelle eine grüne Zone (besonders deutlich bei auffallendem Lichte gegen einen schwarzen Hintergrund); beim Umschütteln teilt sich die grüne Fluoreszenz der ganzen Flüssigkeit mit, die bei durchfallendem Lichte rosenrot ist.

In stark pigmentierten, gallenfarbstoffhaltigen Harnen gelingt der spektroskopische Nachweis schwer oder gar nicht; man beseitigt durch eine Mercurisulfatlösung (5 g HgO, 20 ccm Schwefelsäure und 100 ccm Wasser) die störenden Farbstoffe, indem man zu 10 ccm Harn 5 ccm der Lösung gibt und das klare Filtrat zur spektroskopischen Prüfung verwendet (Denigès).

5. Grimbert²⁾ vereinigt die Verfahren von Roman und Delluc und von Denigès.

Grimbert fügt zu 30 ccm Harn 20 ccm vom Reagens nach Denigès, läßt 5 Minuten stehen und schüttelt die in einen Scheidetrichter filtrierte Flüssigkeit mit 5 ccm Chloroform aus; wenn Emulsion sich bildet, filtriert man durch Watte. Zur Chloroformlösung gibt man so lange von der alkoholischen Zinkacetatlösung hinzu, als eine Trübung entsteht. In dem Augenblick, in dem die Flüssigkeit sich aufhellt, erscheint die charakteristische grüne Fluoreszenz.

M. C. Carrez³⁾ verfährt ebenso; er schüttelt das Filtrat nach der Behandlung des Harnes mit saurer Quecksilbersulfatlösung erst mit Talk, der das Urobilin absorbieren soll und zieht aus dem abfiltrierten und ausgewaschenen Rückstande das Urobilin mit ammoniak- oder salzsäurehaltigem Alkohol aus. Aus der sauren alkoholischen Lösung entfernt man das Urobilin mit Chloroform, indem man sie mit 100 ccm Wasser und 5–6 ccm Chloroform schüttelt. Die Chloroformlösung versetzt man tropfenweise mit der Zinkacetatlösung, bis sich die Mischung klärt; es erscheint die grüne Fluoreszenz und spektroskopisch betrachtet das erwähnte Band. Den Specksteinniederschlag kann

¹⁾ Journ. Pharm. Chim. 1900. 6 Ser. 12. 49.

²⁾ Ebenda. 1904. 6 Ser. 19. 425.

³⁾ Rep. Pharm. 1911. 67. 145; Annal. Chim. anal. appl. 1911. 16. 337; Pharm. Centralh. 1912. 53. 170.

man schneller mit dem Reagens nach Oliviéro (10 g Zinkchlorid in 30 g Ammoniak gelöst und mit 80 g 90%igem Alkohol und 20 g Essigäther versetzt) ausziehen.

Als Vorteil wird hervorgehoben, daß man aus größeren Mengen Harn das Urobilin gewinnen kann. Ob Talk das Urobilin quantitativ aufnimmt, wird nicht gesagt. Weiter ist wohl auch auf das Urobilinogen Rücksicht zu nehmen.

6. Verfahren nach Jolles.

50 ccm Harn werden mit 5 ccm verdünnter Kalkmilch und 100 ccm Chloroform mehrere Minuten in einem Cylinder geschüttelt; den Bodensatz vom Chloroform und den Niederschlag läßt man in eine Porzellanschale abfließen, dampft ein und verreibt den Rückstand mit 5 ccm etwa 30%igen Alkohols und einigen Tropfen Salpetersäure, worauf man filtriert. Typisches Urobilin gibt dabei ein braun-bis granatrotes Filtrat, dessen Spektrum den Urobilinstreifen in scharfer Begrenzung zeigt.

Beurteilung.

Durch diese Isolierungsart sollen normale Farbstoffe entfernt werden.

Th. Hausmann¹⁾ empfiehlt, 10–20 ccm Harn mit 1–2 ccm einer 10%igen Kupfersulfatlösung (zur Oxydation des Urobilinogens) zu versetzen und dann mit 2 ccm Chloroform vorsichtig auszuschütteln. Außer der Kupferlösung führen auch starke Lösungen anderer Schwermetallsalze und Säuren das Urobilinogen in Urobilin über und machen es durch Chloroform extrahierbar; man verwendet von den Säuren, die nach Hausmann im allgemeinen vorzuziehen sind, zu etwa 20 ccm Harn etwa 6–8 Tropfen der konz. oder 20 Tropfen der verdünnten Säuren.

Bei diesem Verfahren soll kein anderer Harnfarbstoff in das Chloroform übergehen mit Ausnahme des Gallenfarbstoffes, der jedoch zum Unterschiede von Urobilin auch aus dem nativen Harn in Chloroform und zum Unterschiede von Urobilin aus dem mit Kupfersulfat behandelten Urin nicht ins Chloroform übergeht, wohl aber nach der Behandlung des Harnes mit den Salzen anderer Schwermetalle und mit Säuren.

P. Descomps²⁾ behandelt 100 ccm Harn mit 60 g Ammoniumsulfat, säuert mit 5 Tropfen einer 1%igen Schwefelsäure an und gibt 5 ccm Gramsche Jodlösung zu; es wird darauf anhaltend geschüttelt und das nach 1 Stunde in gelben Flocken abgeschiedene Urobilin mit 25–50 ccm Amylalkohol durch wiederholtes kräftiges Schütteln gelöst. Die amylnalkoholische Lösung trennt man ab, filtriert sie durch Watte und behandelt einen Teil am besten mit dem Reagens von Roman-Delluc (alkohol. Zinkacetatlösung, s. S. 491). Es erscheint die bekannte Fluoreszenz.

Ein ähnliches Verfahren, es werden alkoholische Zinkacetatlösung und eine verdünnte alkohol. Jodlösung angewendet, gibt G. Rodillon³⁾ an. Übrigens hat früher schon F. A. Steensma darauf hingewiesen, daß man die Reaktion durch Zusatz von wenig alkoh. Jodtinktur schärfer machen kann.

Die Probe von A. Edelmann⁴⁾ beruht auf der von Schmidt gefundenen Tatsache, daß Urobilin mit einer konz. alkoholischen Sublimatlösung einen roten, in Amylalkohol löslichen Farbstoff bildet. Zum Amylalkohol fügt man einige Kubikzentimeter alkohol. Chlorzinklösung.

Wahl der Methode beim qualitativen Nachweis.

Es können sämtliche Proben empfohlen werden. Gelingt der Nachweis nicht, so hätte man aus einer größeren Harnmenge den Farbstoff zu isolieren; übrigens wäre dies ein Zeichen, daß Urobilin in vermehrter Menge nicht vorhanden ist. Der Harn darf nicht etwa mit Formaldehyd konserviert sein.

Quantitative Bestimmung.

Außer der bei der Darstellung (S. 486) angegebenen Bestimmung des Urobilins durch Wägen des isolierten Farbstoffes kann man seine Menge auch annähernd bestimmen und zwar durch den Vergleich der Chloroform-

¹⁾ Zeitschr. exp. Patholog. Therap. 1913. 13. 373; Zeitschr. f. klin. Mediz. 1922. 94. 12.

²⁾ Nouv. Remèdes 1914. 29. 459; Pharm. Centralh. 1915. 56. 581.

³⁾ Journ. Pharm. et Chim. 1922. [7] 26. 379; Chem. Centralbl. 1923. 94. II. 226.

⁴⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1915. 28. 978.

lösung des isolierten Urobilins mit einer Lösung von bestimmtem Urobilingehalte nach Art der Indicanbestimmung.

Man isoliert den Farbstoff nach F. Müller und Huppert, wie S. 487 erwähnt und löst das aus der ammoniakalischen Lösung durch Säure gefällte Urobilin in einem bestimmten Volumen Chloroform. Eine Bestimmung gibt auch Tsuchija¹⁾ an, ebenso G. Fromholdt.²⁾

W. Hildebrandt³⁾ benutzt das Schlesingersche Reagens für klinische Zwecke. 10,0 Zinkacetat werden mit 100 g absoluten Alkohols versetzt. Vor dem Gebrauch ist umzuschütteln.

Ausführung der Probe.

Die Bestimmung wird mit einem Taschenspektroskope bei engem Spalte und scharf eingestellten Fraunhoferschen Linien vorgenommen.

Wenn bei der stark fluoreszierenden Probe (in einem Reagenzglas von etwa 1,5 cm Durchmesser bei Tageslicht) kein Absorptionsstreifen oder nur ein undeutlicher bemerkbar ist, so gilt die Reaktion als positiv; stark positiv ist die Probe, wenn ein deutlicher Absorptionsstreifen bis zu etwa 2 mm Breite vorhanden ist; bei größerer Breite des Absorptionsstreifens gilt die Probe als sehr stark positiv. Ist die ganze violette Seite des Spektrums von Linie *b* an absorbiert, so ist eine besonders starke Urobilinurie anzunehmen, zumal wenn bei Verdünnungen die ganze Absorption bleibt, mithin nicht durch Gallenfarbstoff bedingt ist, der die violette Seite des Spektrums diffus absorbiert. Man kann sich zwischen diesen Abstufungen noch weitere konstruieren. Man erfährt den relativen Gehalt an Urobilin; für diesen ist noch ein Maßstab das Verhalten des Streifens. Man untersucht das Filtrat von 10 ccm Harn und 10 ccm Reagens (man läßt 24 Stunden stehen, bevor man filtriert) in einem keilförmigen Glasgefäße, das durch ein entsprechendes, mit wässrigem 50%igem Alkohol gefülltes zu einem planparallelen Körper ergänzt ist und bestimmt die Schichtdicke, in der der charakteristische Streifen entweder eben verschwindet oder eine bestimmte Breite und Intensität besitzt und vergleicht mit Urobilininlösungen bekannter Konzentration. Für solche kann man sich das keilförmige Gefäß ein für allemal eichen.

Flatow und Brünell⁴⁾ empfehlen ein Verfahren mit Hilfe des Autenriethschen Kolorimeters, Th. Hausmann⁵⁾ benützt ein von E. Seitz in Berlin hergestelltes Urobilinometer, auch E. Kobe, J. Th. Peters beschreiben Apparate für die Urobilinbestimmung usw. Eine quantitative Schätzung von Urobilin gibt L. Pincussen⁶⁾ an.

Eigenschaften.

Das Urobilin ist amorph, zeigt in dünnen Schichten rosenrote, in dicken bräunlichrote Färbung, im auffallenden Lichte lebhaft gelbgrünen Metallglanz, wie Rosanilinsalze. Es löst sich wenig in Wasser, leicht in Alkohol, in Äther, in Chloroform, Amylalkohol, in wässriger Alkalilauge und in Ammoniak, damit in Wasser und in Alkohol leicht lösliche Salze bildend. Aus salzgesättigten Lösungen wird es von Äther, Amylalkohol, Chloroform aufgenommen. Die neutralen Lösungen sind gelb bis gelbrot, die alkalischen mehr gelb, die sauren rosa bis bräunlichrot. Der Zusatz einer Säure bedingt Ausscheidung des Urobilins in braunen Flocken. Durch basisch essigsaures Blei, durch Ammoniumsulfat, auch durch Chlorzinklösung wird der Farbstoff gefällt; die ammoniakalische Lösung fluoresciert; durch Chlorzink und andere Zinksalze zeigt sich diese grüne Fluoreszenz bei zugleich rosenroter Färbung der Lösung auch bei starker Verdünnung sehr vermehrt. Spektroskopisch lassen die Lösungen die erwähnten charakteristischen Absorptionsstreifen erkennen.

¹⁾ Zeitschr. exp. Patholog. Therap. 1904. 7. 352.

²⁾ Ebenda. 1909. 7. 716.

³⁾ Münch. med. Wochenschr. 1909. 57. 765.

⁴⁾ Münch. med. Wochenschr. 1913. 60. 234.

⁵⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1913. 39. 360.

⁶⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1922. 48. 1074.

Die Quecksilberverbindung hat eine schön rosenrote Farbe; auch das Schütteln mit Kalomel bewirkt die gleiche Farbe. Kupferoxydsalze (auch Kobalt- und Nickelsalze) geben in alkalischer Lösung eine der Biuretreaktion ähnliche Färbung; das Kupfersalz ist in Chloroform mit karminroter Farbe löslich.

Das Urobilin wird durch Einwirkung von oxydierenden oder reduzierenden Stoffen leicht verändert; bei der alkalischen Gärung des Harnes wird es in Urobilinogen übergeführt.

E. Das Urobilinogen.

Das Urobilinogen, das erst nach Einwirkung von Sonnenlicht und Luft zu Urobilin wird, ist farblos und zeigt direkt spektroskopisch kein charakteristisches Verhalten; es löst sich in Essigäther, Chloroform usw. wie das Urobilin; nur von Wasser wird es aus der Essigätherlösung nicht aufgenommen, dagegen auch von Ammoniumsulfat gefällt.

Nachweis (s. S. 489).

F. Urorosein.

Das Urorosein kommt nach M. Nencki und N. Sieber¹⁾ immer als Chromogen im Harn vor und findet sich nach Rosin in geringer Menge in jedem Harn, nach den Erstgenannten nur im pathologischen Harn bei Diabetes, bei Chlorose, bei Typhus, bei Nephritis, bei Carcinoma ventriculi.

M. Weiss und B. Smiecinzewski²⁾ fanden, daß das Chromogen im normalen Harn vorkommt und daß gesteigerte Fäulnis im Darmtrakte eine Vermehrung veranlaßt. Von Bedeutung wäre das häufigere Auftreten bei Carcinomen des Digestionstraktus, auch bei Magencarcinomen sollen pathologische Uroroseinwerte vorgefunden worden sein.

Man wird auf diesen im Harn vorhandenen Farbstoff häufig aufmerksam gemacht, da er bei verschiedenen Reaktionen, z. B. bei den Eiweißproben mit Salpetersäure u. a. entsteht.

C. A. Herter³⁾ hat nachgewiesen, daß das Auftreten des Farbstoffes auf die Gegenwart von Indoleessigsäure und Nitriten zurückzuführen ist, da beide im Darm bei der Gärung durch Einwirkung von Bakterien auf Tryptophan, einem bekannten Eiweißabbauprodukte, entstehen.

Nach P. de Lama⁴⁾, auch nach Maillard⁵⁾ soll dieses Chromogen mit dem des Indirubins in kleinen Mengen normalerweise im Harn auftreten und soll oft sogar ein gewisses Verhältnis zwischen beiden, nach Lama zwischen Urorosein und Indican bestehen.

¹⁾ Journ. prakt. Chem. N. F. 1882. 26. 333.

²⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1912. 25. 52; Münch. med. Wochenschr. 1912. 59. 156.

³⁾ Journ. of Biolog. Chem. 1908. 4. 253.

⁴⁾ Jahresber. Fortschr. Tierchem. 1911. 41. 210.

⁵⁾ Zeitschr. angew. Chem. 1909. 22. 1241.

V. Arnold¹⁾ hat in verschiedenen pathologischen Harnen, besonders in den von Scharlachrekonvaleszenten von der 3. Woche an neben Urorosein einen diesem ähnlichen Farbstoff gefunden, den er Nephrorosein nennt.

Darstellung und Nachweis.

Nach M. Nencki und N. Sieber werden 50–100 ccm Harn mit 5 bis 12 ccm 25%iger Schwefelsäure oder auch Salzsäure versetzt; bei Gegenwart des Farbstoffes nimmt der Harn in einigen Minuten eine rötliche bis schön rosenrote Färbung an. Der Harn wird mit einigen Kubikzentimetern Amylalkohol vorsichtig zum Vermeiden einer Emulsion geschüttelt; der Amylalkohol nimmt den Farbstoff auf.

Die Lösung zeigt einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E* im Grün.

Reichlicher erhält man den Farbstoff, wenn man größere Mengen Harn konzentriert, diese ansäuert und den Farbstoff auf entfetteter Wolle, nach reichlichem Zusatze von essigsaurem Natron, fixiert. Aus der mit Wasser ausgewaschenen Wolle gewinnt man den Farbstoff durch Auskochen mit absolutem Alkohol, dem etwas Schwefelsäure zugesetzt ist.

Durch Einwirkung von Salzsäure, schneller von Salpetersäure oder von Salzsäure mit sehr wenig Chlorwasser oder ganz verdünnter Kaliumnitritlösung auf den Harn tritt, zumal im chromogenreichen Harn, eine rote Farbe ein, wie man sie auch bei manchem Harn beim Behandeln mit $\frac{1}{10}$ Vol. 25%iger Schwefel- oder Salzsäure beobachten kann; beim Schichten von Harn auf Salpetersäure entsteht ein rosaroter Ring, der allerdings auch von Indigorot herrühren kann.

Ein Überschuß des Oxydationsmittels (Nitrit) zerstört den Farbstoff.

Beurteilung.

Unerläßlich ist die spektroskopische Prüfung. Die Trennung von Indigorot s. S. 497.

Zu dem Eintreten dieser Reaktion bei manchen Harnen nach Zusatz von Säure wäre zu bemerken, daß eine solche wohl zustande kommt bei gleichzeitigem Vorkommen von Indolessigsäure und Nitriten (es können auch andere oxydierende Substanzen mitwirken) im Harn. Durch einen Überschuß von Nitriten im Verhältnis zu der vorhandenen Menge Indolessigsäure kann die Reaktion gestört werden. Indolessigsäure und Nitrite können, wie S. 494 angegeben, im Harn entstehen. Zu berücksichtigen ist auch noch, daß beim längeren Stehen von Harn Nitrite aus Nitraten infolge von Bakterienwirkung entstanden sein können.

Eigenschaften.

Der Farbstoff löst sich mit roter Farbe in Wasser, in saurem Alkohol, in Amylalkohol, er ist unlöslich in Chloroform, in Äther (Unterschied vom Indigorot), in Benzol. Alkalien entfärben die rote Farbe sofort — Unterschied vom Indigorot — unter Bildung gelbgefärbter Salze. Durch Säuren wird die rote Farbe wieder hergestellt. Durch Reduktion mit Zinkstaub in saurer Lösung wird der Farbstoff schnell entfärbt, die Leukoverbindung geht in Äther über, an der Luft färben sich die Lösungen schnell wieder rot. Der Farbstoff ist sehr unbeständig und wird auch durch Fäulnis zerstört; er oxydiert sich schnell. Aus seiner wässrigen Lösung läßt er sich durch Wolle anfärben. Nach A. Ellinger und Cl. Flamannd scheint das Urorosein, wie das Skatolrot zu der von ihnen dargestellten Gruppe der Triindylmethanfarbstoffe zu gehören (O. Hammarsten).

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 61. 240; 1911. 71. 1.

G. Indigoblau — Indican (S. 369).

H. Indigorot (Indirubin, Urorubin, Urrhodin, Indigpurpurin)
 $C_{16}H_{10}N_2O_2$.

H. Rosin¹⁾ hat schon gefunden, daß der in den meisten normalen und pathologischen Harnen bei der Behandlung mit Salzsäure und beim ununterbrochenen Kochen dieser Harnen sich bildende rote Farbstoff, der auch schon von Rosenbach bei seiner Reaktion — Behandlung des Harnes mit Salpetersäure, der Hauptfarbstoff ist hier wohl in den meisten Fällen Indigorot — beobachtet wurde, mit dem pflanzlichen Indigrot (Indirubin), das nach Baeyers Untersuchungen dem Indigblau isomer ist, die größte Übereinstimmung zeigt. Rosin hält das dem Indigblau isomere Indigorot für ein Produkt der Wärmewirkung und betrachtet als Muttersubstanz des roten Farbstoffes in den meisten Fällen die Indoxylverbindungen des Urins, die Indoxylschwefelsäure und die Indoxylglycuronsäure, die durch Spaltung mit folgender Oxydation in die zwei isomeren Substanzen, in das Indigoblau und Indigorot, übergehen.

Diese Anschauung Rosins hat durch die Versuche von L. Maillard, von Bouma (S. 376, 381) ihre Bestätigung gefunden. Maillard hat nachgewiesen, daß das Indigorot aus den Indoxylverbindungen bei langsamer, das Indigoblau bei augenblicklicher Oxydation entsteht und somit eine Modifikation des Indigoblaus darstellt.

Nach Maillard²⁾ enthält der Harn normalerweise in sehr kleinen Mengen die Chromogene zweier roter Körper, des Indirubins und des Uroroseins, die unter gewissen Umständen in größerer Menge auftreten; aber nur diesen beiden Körpern allein sind die verschiedenen Farben zuzuschreiben, die sehr oft als besondere unter verschiedenen Namen in der Literatur bezeichnet sind. Nach Maillard ist bis jetzt kein Grund vorhanden, die Zahl der im menschlichen Harn authentisch nachgewiesenen roten Farbstoffe zu erhöhen.

Übrigens fand A. Groeber³⁾ in einem frisch entleerten, rosarot aussehenden Harn eines Mädchens, das an chronischer parenchymatöser Nephritis litt, Indigorot fertig gebildet vor.

Aus normalem Harn ist es nur in Spuren zu gewinnen, in größeren Mengen findet es sich bei schweren Darmerkrankungen und Ernährungsstörungen. Der Harn sieht dann oft rötlich bis tief goldgelb aus.

Darstellung.

Hiezu müssen große Mengen Harn Verwendung finden. Indicanreicher Harn wird in Portionen zu etwa 5 Liter mit Bleiessig ausgefällt und filtriert, aus dem Filtrate das im Überschuß vorhandene Blei durch Salzsäure entfernt und die filtrierte Lösung nach dem Versetzen mit Salpetersäure (auf 1 Liter etwa 20 g) zum Kochen erhitzt, bis eine dunkel kirschrote

¹⁾ Virchows Archiv. 1891. **123**. 519. 538.

²⁾ Zeitschr. angew. Chem. 1909. **22**. 1241.

³⁾ Münch. med. Wochenschr. 1904. **51**. 61.

Färbung eingetreten ist; man kühlt schnell ab und neutralisiert die freie Säure mit Soda möglichst, so daß nur mehr schwach saure Reaktion vorhanden ist. Man filtriert die aus den verschiedenen Harnportionen auf diese Weise ausgeschiedenen Farbstoffe durch das gleiche Filter ab, wäscht dieses mit Sodalösung und Wasser aus und extrahiert es nach dem Trocknen mit Chloroform am Rückflußkühler auf dem Wasserbade mehrere Male, bis die Chloroformlösung sich blau färbt. Man destilliert aus diesen Chloroformauszügen das Chloroform so weit ab, bis das Indigorot sich ausscheidet, das nach dem Erkalten der Lösung abfiltriert und mit kaltem Chloroform so lange gewaschen wird, bis die Braunfärbung verschwunden ist und das Chloroform sich rot färbt. Der Rückstand wird zur Reinigung mit Äther am Rückflußkühler gekocht, wobei Indigorot in Lösung geht, aus der der Äther bis zur Abscheidung von Krystallen abdestilliert wird. Die Krystalle werden nach 1—2tägigem Stehen abfiltriert und nochmals umkrystallisiert.

Nachweis des Indigorots.

1. Man kocht den Harn längere Zeit unter ganz allmählichem tropfenweisem Zufügen von Salpetersäure; beim Vorhandensein des Farbstoffes wird der Harn dunkelburgunderrot mit violetter Schüttelschaume; nach weiterem Zusetzen der Säure geht die rote Farbe des Harnes und des Schaumes in eine gelbe über. Durch tropfenweisen Zusatz von Ammoniak zur roten Flüssigkeit entsteht ein blauroter Niederschlag, der sich im Überschusse von Ammoniak mit braunroter Farbe löst. (Rosenbachsche Burgunderreaktion.)
2. Zum Trennen des Indigorots vom Urorosein, zum Nachweise des freien Indigorots, neutralisiert man den Harn mit Soda, schüttelt mit Äther aus, wobei Urorosein ungelöst bleibt, und verdunstet die rot gefärbte Ätherlösung. Der Rückstand muß sich in Alkohol mit schön roter Farbe lösen, die beim Erwärmen mit Traubenzucker und Alkali verschwindet, beim Schütteln an der Luft aber wieder zum Vorschein kommt. (Rosin.) Indigorot ist zum Unterschiede von Indigoblau in Äther leicht löslich.

Der sogenannte Skatolfarbstoff von Brieger löst sich in saurem Harne zum Unterschiede von dem Indigorot nicht in Äther, auch nicht in Chloroform, nur von Amylalkohol wird er aus der sauren Lösung aufgenommen, s. Urorosein.

Eigenschaften.

Der Farbstoff krystallisiert in schokoladebraunen sternförmigen Nadeln oder Blättchen mit Kupferglanz, die mit violettroten Dämpfen sublimieren (295—310°).

Das Indirubin ist unlöslich in Wasser, in verdünnten Säuren und Alkalien, löslich in Alkohol, Aceton, in Äther, Essigäther, in Chloroform, in Benzol, Phenol, in heißen fetten Ölen, in ätherischen Ölen, Eisessig usw. mit roter Farbe. Konz. Schwefelsäure löst es als Sulfosäure. Die alkoholische Lösung

zeigt einen Streifen im grüngelben Teile des Spektrums. Es ist bei der Oxydation beständiger, als das Indigoblau; in alkalischer Lösung wird es durch Zinkstaub, Traubenzucker usw. zu farblosem Indirubinweiß reduziert.

I. Skatolrot (S. 381).

J. Urohämatin.

Urohämatin ist ein eisenhaltiger, roter Körper, von Harley aus dem konzentrierten und dann mit Alkohol extrahierten Harne durch Fällen mit Kalkmilch in der Siedehitze gewonnen.

K. Giacosas Farbstoff.

Dieser Farbstoff ist ein Chromogen, nach Giacosa¹⁾ verwandt mit Urohämatin. Das Chromogen kann durch Amylalkohol ausgeschüttelt und durch Bleiessig größtenteils gefällt werden.

L. Farbstoff nach Kunkel,

auch Harnsäurefarbstoff genannt, findet sich im Harnsäureniederschlage, aus dem Harne durch Salzsäure ausgeschieden, und erteilt diesem eine braune Farbe. Er ist stark eisenhaltig, ebenfalls ohne klinische Bedeutung.

M. Hämatoporphyrin (S. 474).

II. Im pathologischen Harne vorkommende Farbstoffe.

A. Blutfarbstoffe (S. 457).

B. Gallenfarbstoffe.

Die Gallenbestandteile (Gallenfarbstoffe und Gallensäuren) werden wohl einzig und allein in den Leberzellen bereitet und fließen bei normalen Verhältnissen in den Darm, um hier zur Verdauung beizutragen und besonders Fette resorbieren zu helfen, so daß im gesunden, normalen Blute keine Galle und im normalen Harne kein Gallenfarbstoff vorhanden ist. Unter pathologischen Verhältnissen tritt die Galle infolge starken Druckes durch Resorption der Gallenbestandteile von den Lymphgefäßen in den Blutstrom und in die Gewebe (hepatogener Ikterus, Stauungsikterus) und erzeugt dann die bekannten ikterischen Erscheinungen (Gelbsucht, Gelbfärbung der Haut, des Augapfels); ein Teil der in das Blut gelangten Galle wird durch die Nieren im Harne ausgeschieden; im Harne sind die Gallenfarbstoffe, selten auch die Gallensäuren, diese in Form ihrer wasserlöslichen alkalischen Salze, vorhanden. Nach H. Fischer²⁾ wird der Gallenfarbstoff durch die Gallensäuren in kolloidaler Lösung gehalten.

Die Gallenfarbstoffe sind Abkömmlinge des Blutfarbstoffes und als das wichtigste physiologische Abbauprodukt desselben zu betrachten; sie werden durch die Leber aus dem Oxyhämoglobin, Hämoglobin gebildet, indem dieses in Eiweiß und Hämatin zerfällt, das nach Nencki und Sieber

¹⁾ Berl. Bericht. 1887. 20. 393 (Ref.).

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1911. 73. 204.

unter Austritt von Eisen und Aufnahme von Wasser in Bilirubin umgewandelt wird.

Der hepatogene Ikterus (Stauungsikterus, mechanischer Ikterus) wird veranlaßt durch eine Hemmung oder durch Aufhebung des Abflusses der Galle aus der Leber infolge einer Verstopfung der Gallengänge durch Gallensteine, Tumoren oder nach Renvers auch dadurch, daß die Konkrementbildung einen chronischen Katarrh der Gallenwege unterhält. Eine lange Dauer des chronischen Ikterus, intermittierendes Fieber und vorausgegangene Koliken sprechen für Steinbildung in den Gallenaussführungsgängen.

Ob die Entstehung des hämatogenen Ikterus (auch chemischer genannt), die Umwandlung von Blutfarbstoff in Gallenfarbstoffe, außerhalb der Leber möglich ist, ist zweifelhaft und wohl nicht wahrscheinlich; zahlreiche Autoren sprechen sich dahin aus, daß jeder Ikterus seine Quelle in der Leber hat, daß es ohne Anteil der Leber keinen Ikterus geben kann. F. Blumenthal möchte die Leydensche Unterscheidung eines hepatogenen und hämatogenen Ikterus beibehalten wissen und bezeichnet als letzteren einen solchen, bei dem die Entstehung des Farbstoffes aus dem Zerfalle der roten Blutkörperchen, der Erythrocyten, stattfindet.

Der hepatogene Ikterus, der auch Änderungen in den Nieren hervorzurufen pflegt, tritt stark auf bei akuter gelber Leberatrophie (hier werden noch gefunden Gallensäuren, Eiweiß, Leucin, Tyrosin, fettig degenerierte Harncylinder, Fett), beim Verschlusse des Gallenganges, bei der Weilschen Krankheit (akuter, fieberhafter Ikterus, hier auch Eiweiß, Blutkörperchen, Cylinder), bei hypertrophischer Lebercirrhose, bei katarrhalischem Ikterus, weniger stark bei Leberkrebs (hier starke Indicanausscheidung), bei Lebersyphilis, bei Leberabsceß.

Ein hämatogener Ikterus im Sinne der oben angeführten Unterscheidung wäre zu finden nach Vergiftungen mit Phosphor, mit Arsenwasserstoff, mit Äther, mit Chloroform, mit Anilin usw., nach Infektionskrankheiten (Typhus, Scharlach), bei Carcinom. Nach den Forschungen von Naunyn, Minkowski und Stadelmann ist der nach der Darreichung von blutkörperchenzerstörenden Giften der eben genannten Arten hervorgerufene Ikterus ein hepatogener, dadurch veranlaßt, daß die Gallenwege eben die in allzu großer Menge aus dem Zerfalle der Blutkörperchen gebildeten Gallenfarbstoffe nicht abzuleiten imstande sind, es tritt eine Zurückstauung in das Blut ein.

Auch nach Bunge ist der hämatogene Ikterus ein Stauungsikterus, die Stauung wird durch eine Behinderung des Abflusses der reichlich gebildeten, dicklichen Galle bewirkt.

Ikterischer Harn zeigt eine safrangelbe, rötlichbraune, braune (bierähnliche), auch ins Grüne schillernde Farbe — nach einigem Stehen des Harnes kommt die grüne Farbe mehr und mehr zum Vorschein —, schäumt stark beim Schütteln mit einem mehr oder weniger gelb oder

grünlichgelb gefärbten Schaume (Rheum- und Sennaharne S. 508); beim Filtrieren hinterläßt er auf dem Filter einen gelben Belag; an der Wäsche finden sich gelbe Urinflecken; die Färbung entspricht häufig nicht dem Gehalte an Bilirubin. Mit der Ausscheidung der Gallenbestandteile können, wie erwähnt, auch Eiweißabsonderungen verbunden sein, der Harn kann trüb sein — ikterischer Harn ist gewöhnlich undurchsichtig — und ein Sediment bilden, das aus reichlichem, oft gelbgefärbtem Epithel, aus gelbgefärbten, auch mit Farbstoffkörnern versehenen hyalinen Cylindern, auch aus freien kleineren oder länglicheren Körnchen von grüner bis schwarzer Farbe, widerstandsfähig gegen Reagenzien, aus Leucin, Tyrosin, bestehen kann. Ikterischer Harn zeigt stets saure Reaktion, deswegen enthält er häufig Urate, Harnsäure, von den Gallenfarbstoffen gefärbt. Bilirubin wird nicht selten in dem mit Salzsäure angesäuerten Harne in braunen Nadeln abgeschieden. Bei deutlicher Abnahme der täglichen Harnmenge kann das Vorkommen von Nierenepithelien und Cylindern eine ernstere Erscheinung, ein Ergriffensein der Niere bedeuten. Von den verschiedenen Farbstoffen sind mit voller Sicherheit im frischen ikterischen Harne nur das goldgelbe Bilirubin (meist als Alkaliverbindung), das grüne Biliverdin (meist nach dem Stehen des Harnes), bisweilen auch Urobilin (Urobilinogen) aufgefunden worden. Das Bilirubin wird als die Muttersubstanz der weiteren Gallenfarbstoffe — Biliverdin, Biliprasin, Bilifuscin und Bilihumin — angesehen; die drei letzteren fanden sich in Gallensteinen.

Fromholdt und Nersessoff¹⁾ meinen, daß die Farbe des ikterischen Harnes nicht durch Bilirubin, sondern durch andere Farbstoffe bedingt ist (?).

Nachweis der Gallenfarbstoffe.

Enthält der Harn Blut und Blutfarbstoff neben dem Gallenfarbstoffe, so fällt man den Gallenfarbstoff durch Bleiessig, filtriert den Niederschlag ab, zersetzt ihn nach dem Auswaschen mit kohlensaurem Natron und benützt das Filtrat oder die durch Ausschütteln mit Chloroform erhaltene Farbstofflösung zum Nachweise von Gallenfarbstoffen.

1. Methode von L. Gmelin, F. Tiedemann.²⁾

Nach E. Ebstein (a. a. O.) hat Marabelli schon im Jahre 1787 die Salpetersäureprobe ausgeführt, so daß sie als Marabellische zu bezeichnen ist.

Die Reaktion mit ihren fast unzähligen Abänderungen beruht auf der allmählichen Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin (grüne Färbung); bei weiterer Oxydation entstehen die anderen Farbstoffe (Blau zu Gelb).

In ein Reagenzglas gibt man etwa 5 ccm konzentrierter schwach gelber Salpetersäure (am besten reiner Salpetersäure, der man auf etwa 100 ccm 1—2 Tropfen rauchender Salpetersäure zugesetzt hat) und auf diese vorsichtig, ohne daß eine Vermischung der Flüssigkeiten eintritt, am Rande des am besten schiefgehaltenen Glases entlang mit einer Pipette ebensoviel Kubikzentimeter Harn. Es entsteht bei Anwesenheit von Gallenfarbstoffen — bei geringem Farbstoffgehalte nicht immer sofort — an der Berührungsstelle der charakteristische smaragdgrüne Ring, der allmählich höher steigt,

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1921. 125, 149, 153.

²⁾ Die Verdauung nach Versuchen. Leipzig u. Heidelberg. 1826. 1. 80.

Bilirubin $C_{33}H_{36}N_4O_6$ (Küster)	Biliverdin $C_{32}H_{38}N_4O_8$	Biliprasin $C_{32}H_{44}N_4O_{12}$	Bilifuscin $C_{32}H_{40}N_4O_8$
Kommt in der Galle und in den Gallensteinen vor. Es läßt sich aus seiner Chloroformlösung in roten, rhombischen Tafeln krystallisiert gewinnen. In Wasser ist es unlöslich, wenig löslich in Äther, leichter in Alkohol, leicht in Chloroform; in Alkalien löst es sich leicht und wird durch Säuren daraus wieder abgeschieden. Es kommt dem Gallenfarbstoffe der Charakter einer Säure zu. Mit den alkalischen Erden und den Oxyden der Schwermetalle bildet es in Wasser unlösliche Verbindungen. In alkalischen Lösungen verwandelt sich das Bilirubin unter Absorption von Sauerstoff in grünes Biliverdin. Eine Bilirubinlösung in Chloroform färbt sich beim allmählichen Zusatz von Salpetersäure (etwas rauchende enthaltend) oder von Bromwasser erst grün, dann blau, violett, rot, und endlich gelb. Naszierender Wasserstoff führt Bilirubin in Hydrobilirubin, das aber ein Farbstoffgemisch sein soll, über; durch Fäulnisbakterien erfolgt Reduktion zu Urobilin. Durch Destillation mit Zinkstaub entsteht aus dem Bilirubin Hämo-pyrrol wie beim Blutfarbstoff. Das Bilirubin enthält wie der Blutfarbstoff vier Pyrrolkerne und gibt wie das Häm beim oxydativen Abbau Hämatinsäure (W. Küster, Hans Fischer).	Findet sich in der Galle und in Gallensteinen, in ikterischen Harnen, die nach längerem Stehen grün geworden sind, und in den aus dem Magen erbrochenen grünen Massen. Es bildet ein amorphes, schwarzgrünes Pulver, unlöslich in Wasser, in Äther und Chloroform, löslich in Äthyl- und Methylalkohol mit blaugrüner Farbe, die durch eine Spur Säure feurig grün wird. Es löst sich in Alkalien mit grüner Farbe und wird durch Säuren in Form von grünen Flocken gefällt. In konzentrierter Essigsäure und Salzsäure löst es sich gleichfalls; mit Salpetersäure gibt es die gleichen Reaktionen, wie das Bilirubin. Vom Bilirubin läßt es sich durch die verschiedene Löslichkeit trennen.	Bildet ein amorphes, grünlich schwarzes Pulver; in Wasser, Äther, Chloroform unlöslich; löst sich in Alkohol mit rein grüner Farbe; auf Zusatz von Ammoniak wird die Lösung braun (Unterschied vom Biliverdin). In Alkalien ist es leicht löslich mit brauner Farbe, die durch Säure in Grün übergeht (Unterschied vom Bilifuscin). Man nimmt deshalb an, daß die braunen, ikterischen Harnen, die sich auf Zusatz einer konzentrierten Mineralsäure grün färben, Biliprasin enthalten.	Scheint außer in Gallensteinen aber auch im Harn vorzukommen. Dunkelbraun, unlöslich in Wasser, Äther, Chloroform; löst sich aber in Gegenwart von fetten Säuren in Äther und in Chloroform; die braune Lösung im Alkohol ändert sich durch Säuren nicht. Das Endprodukt der Oxydation aller Gallenfarbstoffe in alkalischer Lösung an der Luft ist das Bilhum in, das sich auch in den Gallensteinen als schwarzbrauner Körper findet.

Diese beiden Farbstoffe, Derivate des Bilirubins, scheinen noch nicht vollkommen rein dargestellt zu sein, da die von verschiedenen Forschern gewonnenen Farbstoffe auch verschiedene Eigenschaften zeigen.

Cholecyanin (Bilicyanin, Choleverdin) entsteht bei der Oxydation der Gallenfarbstoffe bei Gegenwart von Chlorzink. Die neutralen oder sehr schwach sauren Lösungen sind blaugrün, stahlblau mit roter Fluoreszenz; die alkalischen Lösungen besitzen grüne, die schwach sauren schön rote, die stark sauren violettblaue Farbe.

Choletelin ist das letzte Oxydationsprodukt der Einwirkung von Salpetersäure auf Bilirubin.

Siehe W. Küster¹⁾ über Bilirubin, Biliverdin und ihre Spaltungsprodukte.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1909. 59. 61.

und an der unteren Grenze nach und nach ein blauer, violettroter und gelber Ring. Manchmal tritt infolge zu großen Gehaltes der Salpetersäure an salpetriger Säure eine zu stürmische Entwicklung ein und die Reaktion wird undeutlich.

Man kann die Probe auch nach Brücke-Fleischl-Vitali so ausführen, daß man zu dem Harn eine konzentrierte Natriumnitratlösung gibt und dann konzentrierte Schwefelsäure langsam nachfließen läßt. Die Reaktion tritt langsam ein und hält längere Zeit an.

Crouzel nimmt ein Gemisch aus 3 Vol. reiner Schwefelsäure und 1 Vol. reiner Salpetersäure. Schichtprobe!

Abänderung von O. Rosenbach.¹⁾

Man filtriert eine größere Menge Harn durch ein kleines Filter aus absolut reinem, weißem Filtrierpapier und betupft die innere Seite des noch feuchten Filters mit einem Tropfen der rauchende Salpetersäure enthaltenden Salpetersäure; auch kann man einen porösen Tonteller (Biskuiteller) mit dem Harn tränken und in gleicher Weise mit 1—2 Tropfen der Säure betupfen (Dragendorff); man erhält das gleiche Farbenspiel in Form der konzentrischen Ringe wie bei 1, von innen nach außen gelbrot, rot, violett, blau, grün.

Tuz²⁾ hat ähnlich wie Biffi 200 cem Harn mit 1 cem 5%iger Schwefelsäure und 10 cem 10%iger Bariumchloridlösung versetzt. Der Niederschlag wird nach dem Abgießen der Flüssigkeit auf einem Filter gesammelt, dessen Boden mit hygroskopischer Watte belegt ist; auf der Watte liegt eine Scheibe Filtrierpapier, auf die man einen Tropfen des Gmelinschen Reagens (8 Teile Salpetersäure [1,4] und 2 Teile rauchende Salpetersäure) bringt. Reaktion die bekannte.

Bonanno³⁾ läßt eine Flüssigkeit aus 0,2 g Natriumnitrat und 10 cem Salzsäure verwenden, die man in einer verschlossenen Flasche verwahrt. Im ikterischen Harn entsteht grüne Färbung beim Eintropfen der Flüssigkeit.

Ähnlich sind auch die Verfahren von Vitali, Klehbiel, Masset u. a., die Kaliumnitrit und Schwefelsäure (Salzsäure) als Reagens empfehlen.

Beurteilung.

Charakteristisch für die Gegenwart der Gallenfarbstoffe ist nur die auftretende Grünfärbung, der grüne Ring, da die blaue und rote Färbung auch andere Farbstoffe (Indican) geben. Die Salpetersäure darf nicht zuviel salpetrige Säure enthalten, da die Reaktion sonst stürmisch und sehr schnell verläuft.

Urine mit geringem Gallenfarbstoffgehalte geben die Reaktion nicht immer. Die Rosenbachsche Modifikation ist etwas schärfer, da man durch Filtrieren größerer Harnmengen die Gallenfarbstoffe im Filter anreichern kann. Zu bemerken ist, daß auch nach Antipyringenuß infolge Bildung von Nitrosoantipyrin ein grüner Ring entstehen kann (P. Süß).

Manche dunkelgefärbten Harn, die Gallenfarbstoff besonders in geringer Menge enthalten, geben die Reaktion mit Salpetersäure nicht, wenn andere Farbstoffe (Urobilin, Indican) in größerer Menge zugegen sind; in solchen Fällen muß der Gallenfarbstoff erst isoliert werden, man verfährt nach Methode 2 oder 5.

Aus einem Harn mit geringen Mengen an Gallenfarbstoff und Eiweiß muß letzteres erst entfernt werden.

Sonst ist dieses älteste Verfahren immer noch das einfachste und recht zuverlässig.

Nach Rosenbach kann man ikterischen Harn auch mit einigen Tropfen von 5%iger Chromsäurelösung versetzen, es entsteht eine Grünfärbung bei Anwesenheit von Gallenfarbstoffen. (Kein Überschuß an Oxydationsmitteln, sonst erfolgt Braunfärbung.) Die Probe kann auch als Ringprobe angestellt werden. Mit Chromsäure getränktes Filtrierpapier färbt sich in ikterischen Harn getaucht grün.

Biffi verfährt wie Tuz und bringt einen Krystall Kaliumbichromat auf den noch feuchten Niederschlag auf die Watte, Z. Guerra benützt Eisenchlorid als Oxydationsmittel.

Diese Abänderungen sollen die Reaktion empfindlicher gestalten.

¹⁾ Centralbl. med. Wissenschaft. 1876. 5.

²⁾ Zeitschr. Urolog. 1908. 2. 1038.

³⁾ Münch. med. Wochenschr. 1910. 57. 2603.

2. Probe nach O. Hammarsten.¹⁾

Erforderliche Lösung.

Ein Gemisch von 19 ccm einer 25%igen Salzsäure und 1 ccm einer 25%igen Salpetersäure läßt man einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen, bis es etwas gelblich geworden ist.

Ausführung.

1 ccm der Lösung wird vor dem Gebrauche mit 4 ccm Alkohol von 95–96% verdünnt. Enthält ein Harn reichlich Gallenfarbstoffe, so setzt man zu 2–3 ccm von dem Reagens einige Tropfen des Harnes, es tritt sofort die grüne oder blaugrüne Färbung auf; sind nur wenig Gallenfarbstoffe neben anderen in größerer Menge vorhandenen Farbstoffen zugegen, so fällt man 10 ccm des nicht alkalisch reagierenden Harnes mit einigen Kubikzentimetern Barium- oder Calciumchloridlösung, zentrifugiert, gießt die Flüssigkeit vom Bodensatz ab und übergießt diesen mit 1–2 ccm des Reagens. Es tritt Grünfärbung ein. Sind Spuren von Farbstoff vorhanden, so verwendet man ein Säuregemisch von 1 Teil Salpetersäure und 99 Teilen Salzsäure.

Beurteilung.

Sehr empfindliche Methode, die allen Anforderungen genügt. Blutfarbstoff stört nicht.

3. Probe von F. Penzoldt.

Man filtriert Harn durch ein nicht zu großes Filter, läßt dieses trocknen und bringt einige Kubikzentimeter konzentrierter Essigsäure auf das Filter; man läßt die Essigsäure in ein Glas ablaufen; die Essigsäure ist anfangs gelbgrün, später grün bis bläulichgrün gefärbt, während das Filter beim Trocknen grüne Ränder zeigt.

Beurteilung.

Die Methode ist als gute Vorprobe zu betrachten.

4. Nach Trouesseau und Dumontpellier²⁾, H. Rosin³⁾, W. G. Smith und Kathrein überschichtet man vorsichtig in einem Reagenzglas Harn mit 2–3 ccm einer etwa 1%igen alkoholischen Jodlösung; es tritt bei Gallenfarbstoffanwesenheit ein grasgrüner Ring an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeitsschichten ein. Alkalischer Harn ist mit Essigsäure anzusäuern.

Cauquil verwendet als Reagens eine Lösung aus 2 g Jodtinktur, 1 g Jodkali in 100 g Wasser.

Raphael⁴⁾ gibt zu 10 ccm Harn 10 ccm $\frac{1}{10}$ n-Jodlösung und läßt 24 Stunden stehen; wird das freie Jod durch $\frac{1}{10}$ n-Thiosulfatlösung gebunden, so kommt die Grünfärbung des ikterischen Harnes zum Vorschein.

Maréchal läßt den Harn mit Lugolscher Lösung überschichten (smaragdgrüner bis grasgrüner Ring beim Vorhandensein der Gallenfarbstoffe).

F. Obermayer und H. Popper⁵⁾ empfehlen als sicheren Nachweis die Jodsalzsäureprobe und als Reagens eine Lösung von 75 g Chlornatrium, 12 g Jodkalium, 3,5 ccm 10%iger Jodtinktur in 625 ccm Wasser und 125 ccm 95%igem Alkohol. Diese Jodkochsalzsäureprobe empfehlen Herzfeld und Steiger.

¹⁾ Skand. Archiv Physiol. 1899. 9. 313.

²⁾ L'Union med. 1863. 39.

³⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1893. 30. 106.

⁴⁾ Pharm. Centrbl. 1907. 48. 387.

⁵⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1908. 21. 895.

Eine halbprozentige Jodätherlösung nehmen Perkuscher und Gutmann (5 ccm Harn und 1 ccm der Lösung). Die untere grün und grünblau gefärbte Schicht wird nochmals mit Äther behandelt (zur Entfernung von Jod), bis er farblos ist; dann soll die Grünfärbung der wässerigen Schicht sehr deutlich hervortreten.

Beurteilung.

Die Methode ist scharf; Vorhandensein von Antipyrin könnte stören.

5. Um in dunklen, indicanreichen Harnen geringe Mengen Gallenfarbstoffe nachzuweisen, macht man den Harn (100—200 ccm) nach Huppert¹⁾-Hilger²⁾-Salkowski entweder mit kohlensaurem Natron alkalisch und versetzt ihn mit Chlorbarium- oder Chlorcalciumlösung oder fällt ihn mit Barythydrat im Überschusse. Der Niederschlag aus ikterischem Harn ist gelb; wird der abfiltrierte, ausgewaschene Niederschlag mit Alkohol, der einige Tropfen Schwefelsäure (nach Salkowski Salzsäure) enthält, in ein Reagenzglas vom Filter abgespritzt und dann erhitzt, so entfärbt sich der Niederschlag und es entsteht eine sehr schöne grüne bis blaue Lösung. (Man betrachte zumal bei geringen Mengen im auffallenden Lichte und sehe entweder von oben ins Reagenzglas oder halte dieses gegen einen weißen Hintergrund.) Zum deutlicheren Nachweis schüttelt man diese Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser und einigen Kubikzentimetern (5 ccm) Chloroform; dieses färbt sich tiefgrün.

Beurteilung.

Die Methode ist sehr sicher. Rheum- und sennahaltige Harnen geben eine gelbe Lösung. Nach Munck, der diese Probe empfiehlt, sehr empfindlich (noch 0,00002 Bilirubin in 10 ccm Harn zu erkennen). Wenn nach dem Erhitzen keine Farbenänderung eintritt, soll man nach F. A. Steensma, J. C. Schippers einen Tropfen einer etwa $\frac{1}{2}$ -%igen Natriumnitritlösung hinzufügen. Salkowski wendet in solchen Fällen etwas Salpetersäure an.

M. Nakayama erhitzt den durch Zentrifugieren gewonnenen Niederschlag (Fällung wie oben) mit einer Lösung, hergestellt aus 99 ccm abs. Alkohol und 1 ccm rauchender Salzsäure, in der im Liter 4 g Eisenchlorid gelöst sind. Nach W. Macadie³⁾ werden etwa 10 ccm des nötigenfalls mit Essigsäure schwach angesäuerten Harnes mit gesättigter Calciumchloridlösung in genügender Menge versetzt und zwei Minuten zentrifugiert; die Flüssigkeit wird vom Sedimente abgossen und dieses nochmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Absetzen und Entfernen des Wassers löst man das Sediment in einer Mischung aus 1 Teil Salzsäure (1,16 spez. Gew.) und 3 Teilen Alkohol und läßt 5—6 Tropfen Salpetersäure (1,42 spez. Gew.) am Rande des Zentrifugierröhrchens zufließen. In der Flüssigkeit entstehen die bekannten gefärbten Zonen gelb, weinrot, blau, bläulichgrün, grün.

A. A. v. Maslow⁴⁾ setzt zu dem nach Nakayama gewonnenen Niederschlage Alkohol, der 1% Salpetersäure (1,2 D) enthält, dann 4—5 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd und erhitzt zum Kochen (dunkelblaugrün).

Die Probe von Nakayama hält K. Hoesch⁵⁾ für eine sehr scharfe.

6. Probe nach Jolles.⁶⁾

10 ccm Harn werden in einem Probierrohre mit 2—3 ccm Chloroform und 1 ccm einer 10%igen Chlorbariumlösung versetzt,

¹⁾ Archiv der Heilkunde. 8. 351. 467.

²⁾ Archiv Pharm. [3] 6. 385.

³⁾ Pharm. Journ. 1908. [4] 26. 686.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1911. 74. 297.

⁵⁾ Klin. Wochenschr. 1922. 1. 2034.

⁶⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1903. 16. 491; Pharm. Centrbl. 1903. 44. 478.

kräftig geschüttelt und hierauf zentrifugiert. Die über dem Niederschlag und dem Chloroform stehende Flüssigkeit wird vorsichtig abgegossen, das Röhrchen mit destilliertem Wasser gefüllt und wieder zentrifugiert. (Bei stark gefärbten Harnen kann man die Behandlung mit Wasser ein drittes Mal wiederholen.)

Nach dem Abgießen der über dem Chloroform befindlichen Flüssigkeit wird der Rückstand mit etwa 5 ccm Alkohol kräftig geschüttelt und das Filtrat mit 2—3 Tropfen einer Jodlösung (0,63 g Jod und 0,75 g Quecksilberchlorid werden in je 125 ccm Alkohol gelöst, die beiden Lösungen vereinigt und mit 250 ccm konzentrierter Salzsäure vermischt) versetzt; es entsteht bei Gegenwart der geringsten Spuren von Gallenfarbstoff die bekannte grüne Färbung. Durch Erwärmen des Glasinhaltes (kurze Zeit im Wasserbade) kann das Entstehen der Färbung beschleunigt werden.

Beurteilung.

Die Methode ist scharf und läßt noch 0,1 mg Bilirubin in 100 ccm Harn erkennen.

7. L. Grimbert¹⁾ empfiehlt folgende Ausführungsweise der von Hammarsten, Salkowski und Jolles angegebenen Proben:

10 ccm (nötigenfalls 100—200 ccm) Harn werden mit 5 ccm 10%iger Bariumchloridlösung versetzt und nach dem kräftigen Schütteln oder Zentrifugieren filtriert. Der aus dem Sulfat, Phosphat und Bilirubin des Bariums bestehende Niederschlag wird mit 4 ccm 90%igem Alkohol, der 5 Vol. Proz. Salzsäure (wie bei Salkowski) enthält, versetzt. Nach kurzem Sieden (1 Minute) läßt man absetzen. Ist die überstehende Flüssigkeit farblos, so sind keine Gallenfarbstoffe vorhanden; ist sie blaugrün oder dunkelgrün, so sind solche anwesend. Tritt eine bräunliche Färbung ein, so ist die im Alkohol gewesene Menge Salzsäure zu gering, um alles Bariumbilirubin zu oxydieren. In diesem Falle — aber nur dann — setzt man 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (auf 10 Vol.) zu; nach dem Sieden tritt eine Grünfärbung ein. Bleibt die Blaufärbung, so sind noch bisher unbestimmte braune Gallenfarbstoffe vorhanden.

Beurteilung.

Die Methode soll an Einfachheit und Genauigkeit den anderen überlegen sein.

8. Ausziehen der Farbstoffe mit Chloroform. Schüttelt man 10—20 ccm Harn nach dem Ansäuern mit einigen Tropfen Salzsäure mit der gleichen Menge Chloroform aus (heftiges Schütteln ist zu vermeiden, man dreht besser häufig um, um eine Berührung der Flüssigkeiten zu erzielen) und überschichtet die Chloroformlösung mit Salpetersäure, die wenig salpetrige Säure enthält, oder mit Bromwasser, so tritt das oben angegebene Farbenspiel bei

¹⁾ Journ. Pharm. Chim. 1905. [6] 22. 487.

Anwesenheit von Gallenfarbstoffen ein. Läßt man das Chloroform im Uhrglase verdunsten, so bleiben rotgelbe oder rubinrote Krystalle von Bilirubin zurück, die, mikroskopisch untersucht, auf Zusatz von rauchender Salpetersäure schön die Farbenreaktion geben.

Noch zweckmäßiger ist es, die abgehobene (durch Abpipettieren) Chloroformlösung mit dem gleichen Volumen schwach alkalischen Wassers (Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge) wie angegeben zu mischen. Es wird die in Chloroform unlösliche, in Wasser leicht lösliche Alkali-Verbindung der Gallenfarbstoffe hergestellt. Die wässrige Lösung verwendet man zur Vornahme der Reaktion.

Verfahren, die auf dem Ausziehen des Gallenfarbstoffes mit Chloroform beruhen, sind angegeben von Ultzmann, R. Neumeister, C. Gerhardt, Schwander, F. Sarcinelli, J. Boni, A. Vossius, E. Stadelmann.

Beurteilung.

Das Chloroform muß frei von Alkohol sein wegen der Färbung des letzteren mit der Säure.

9. Empfohlen wird als gute Probe die von A. Gluzinsky¹⁾. Man versetzt Harn mit dem dritten Volumteil Formalin und kocht 2 bis 5 Minuten. Bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff entsteht eine grüne Färbung. Beim Schütteln mit Chloroform nach dem Zusatze von einigen Tropfen Salzsäure wird das Chloroform amethystrot gefärbt, wenn Gallenfarbstoffe vorhanden sind.

Nach W. Arnold wird Bilicyanin gebildet.

10. F. Pröscher²⁾ empfiehlt zum Nachweise von Bilirubin allein die Verwendung der Ehrlichschen Diazoreaktion. Es bildet sich durch Kuppelung ein Azofarbstoff, hier Azobilirubin. Siehe auch Nr. 17.

Man sättigt 10 cem Harn mit Ammoniumsulfat, filtriert den die Farbstoffe enthaltenden Niederschlag ab und zieht das nicht zu groß gewählte Faltenfilter mit 96%igem Alkohol aus. Der alkoholische Auszug wird mit Salzsäure stark angesäuert und mit der Diazolösung (S. 528) versetzt. Bei Anwesenheit von Bilirubin tritt eine schöne blaue Färbung auf, die bei Alkalizusatz durch Rot in Grün umschlägt. In neutraler Lösung ist das Azobilirubin prachtvoll rot. Läßt man zu der sauren Lösung vorsichtig eine nicht zu konzentrierte Kalilauge zufließen, so bilden sich die drei Farbenringe grün, rot, blau.

Beurteilung.

Andere Gallenfarbstoffe (Biliverdin, Bilihumin) geben die Reaktion gar nicht, Bilifuscin und Biliprasin in äußerst geringem Grade.

11. Triollets³⁾ Probe.

50 cem Harn werden mit 40–50 g Ammoniumsulfat gesättigt, der Niederschlag wird durch Watte abfiltriert und diese zuerst mit heißem Chloroform (in Lösung

¹⁾ Wien, klin. Wochenschr. 1897 Nr. 52.

²⁾ Zentralbl. f. innere Mediz. 1901. 22, 169.

³⁾ Rep. d. Pharm. 1901. 392.

Bilirubin und Bilifuscin) und dann mit heißem Alkohol (in Lösung Biliverdin und Biliprasin) behandelt. Die beiden Lösungen werden eingedampft und die Rückstände mit kochendem Wasser aufgenommen; die erhaltene Lösung wird vorsichtig mit rauchender Salpetersäure überschichtet; es entsteht erst ein roter und gelber, nach 10 Minuten zwischen diesen ein grüner Ring, nach 15 Minuten ein blauer zwischen dem roten und dem grünen. Nach 2 Stunden hinterbleibt nur eine blaue Zone zwischen zwei gelben.

Beurteilung.

Störende andere Farbstoffe, Blut, Eiweiß, Eiter werden bei dieser Probe entfernt.

12. Nach H. Günther¹⁾ versetzt man 5 ccm Eisessig mit wenig (nicht mehr als 0,005 g) Magnesiumperhydrol (Merck) und erhitzt zum Sieden. Von dunklem, ikterischem, durch Natronlauge alkalisch gemachtem Harn bringt man einige Tropfen, von hellem alkalischem Harn 5–10 ccm zu dem Reagens. Es tritt sofort oder nach einmaligem Erhitzen eine smaragdgrüne Färbung auf; bei sehr geringer Menge von Bilirubin im Harn kann man die Färbung erkennen, wenn man die Schicht im Proberöhrchen von oben nach unten betrachtet. Nach Zusatz von etwas verd. Salzsäure (einige Tropfen) geht die grüne Farbe in Blau über. Der grüne Farbstoff löst sich in Chloroform; im Spektroskope zeigt der grüne Farbstoff einen breiten Absorptionsstreifen.

Diese Probe wird von E. Ebslein besonders geschätzt.

13. Cholecyanin-(Bilicyanin)probe von Stokvis²⁾. (Büemendijk.)

Ist die Gmelinsche Probe unsicher, so versetzt man 20–30 ccm Harn mit 5–10 ccm Zinkacetatlösung (20%) und stumpft die stark saure Reaktion mit kohlensaurem Natron ab; den entstandenen voluminösen Niederschlag wäscht man auf einem Filter aus und löst ihn in Ammoniak; es wird dadurch das Bilirubin in Cholecyanin (das blaue Oxydationsprodukt, der blaue Ring bei der Gmelinschen Probe) übergeführt. Wenn Gallenfarbstoffe vorhanden sind, zeigt die ammoniakalische Lösung meistens Fluoreszenz und im Spektrum charakteristische Streifen bei C, D und einen schwachen zwischen D und E.

Harn mit Salniakgeist zu überschichten (grüner Ring), empfiehlt F. Betz.

14. In zweifelhaften Fällen kann man den reduzierbaren Stoff von Stokvis, der bei der vollständigen Oxydation der Gallenfarbstoffe entsteht, nachweisen. Man fällt den sauren Harn mit Bleizucker, wenn nötig mit Bleiessig, und entfernt den Bleiüberschuß durch Oxalsäure. Das Filtrat wird mit Kaliumhydroxyd alkalisch gemacht und gekocht; wird die Flüssigkeit mehr oder weniger rot, so sind Gallenfarbstoffe vorhanden; die Lösung zeigt im Spektroskope zwischen D und E einen Streifen oder einen verwachsenen Schatten.
15. Barrals³⁾ Reagens auf Gallenfarbstoffe ist eine 20%ige Lösung von Aseptol (o-Phenolsulfosäure). Man schichtet auf dieses Reagens vorsichtig filtrierten Harn; bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff entsteht ein grüner Ring. Wenn Eiweiß zugegen ist, bildet sich ein weißer Ring.
16. Nach Baudouin⁴⁾ gibt ikterischer Harn mit einigen Tropfen Fuchsinlösung (1:200 Wasser) orangefarbenes Rosanilinbilirubin. v. Mardach⁵⁾ läßt eine sehr verdünnte Eosinlösung verwenden, die mit gallenfarbstoffhaltigem Harn einen gelbbraunen Ton mit leichter Grünfluoreszenz annehmen soll. A. v. Torday u. A. Klier empfehlen Methylviolettlösung (1 Tropfen einer 1%igen Lösung zu 15 ccm Wasser), die mit 1 ccm Harn eine rote Färbung gibt. Methylengrün, Methylenblau, Thionin, Toluidin, Azurblau liefern grüne Färbungen, Dahliagrün und Pyronin gelbe, Kresylviolett und Methylblau-Gentianaviolett rote. Die Lösungen müssen wie angegeben recht verdünnt angewendet werden. Es handelt sich bei diesen Proben, wie sie auch von Neermann, E. Klasten vorgeschlagen wurden, um physikalische Farbmischungen (Roch); den Proben kommt höchstens ein orientierender Wert zu (O. Petersen)⁶⁾.
17. Nach A. Krockiewicz⁷⁾ mischt man je 1 ccm einer 1%igen wässrigen Lösung von Sulfanilsäure und Natriumnitrit, gießt das Gemisch aus dem Reagenzglas,

¹⁾ Med. Klinik 1910. Nr. 27.

²⁾ Centrbl. med. Wissensch. 1872. 4.

³⁾ Pharm. Zeitschr. f. Rußl. 1897. 961.

⁴⁾ La semaine médic. 1902. 398.

⁵⁾ Deutsch. med. Ztg. 1907. Nr. 57.

⁶⁾ Münch. med. Wochenschr. 1911. 58. Nr. 41.

⁷⁾ Münch. med. Wochenschr. 1906. 53. 496.

daß nur wenige Tropfen zurückbleiben, und fügt unter starkem Schütteln etwa $\frac{1}{2}$ ccm Harn zu. Es entsteht eine rubinrote Färbung, die nach Zusatz von 1–2 Tropfen Salzsäure und nach mehrfacher Verdünnung mit Wasser in Amethystviolett übergeht. Bei reichlicher Gallenfarbstoffanwesenheit muß entsprechend verdünnt werden. Die Reaktion zeigt nur Bilirubin und wenig oxydierte Farbstoffe an.

A. Raphael¹⁾ benützt ebenfalls das Diazoreagens; 5 g Sulfanilsäure werden in 100 ccm Wasser und 50 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124) gelöst; die Nitritlösung enthält 0,5% Natriumnitrit. Gibt man zu 2–3 Tropfen Nitritlösung 5 ccm der Sulfanilsäurelösung und zu dieser Mischung 5 ccm vom ikterischen Harn, so färbt sich das Gemisch zuerst amethystfarben, nach einiger Zeit kirschrot. Mischt man 2–3 Tropfen Nitritlösung mit 5 ccm Harn und gibt erst dann 5 ccm Sulfanilsäurelösung zu, so entsteht eine gelbgrüne Färbung, die im Laufe von 24 Stunden rot wird.

18. Auf die Oberflächenspannung und Viskosität gründet sich die Probe nach Haykraft (Hay) (Garés), daß gallenfarbstoffhaltiger Harn im Gegensatz zu normalem Harn die Eigenschaft zeigen soll, daß auf die Oberfläche gebrachte Schwefelblumen nach einigen Minuten untersinken; gallensäurehaltigen Harnen soll diese Eigenschaft besonders zukommen.

Beurteilung.

Die Probe ist nicht einwandfrei, auch bei normalem Harn sinken Teile der Schwefelblumen unter, da die Oberflächenspannung usw. stark einflußbar sind (Germet).

19. Rieglers Probe.

Der durch Chloroform gelöste Gallenfarbstoff gibt in der Chloroformlösung mit einer Mischung von Paranitranilin (5 g in 180 ccm Wasser und 25 ccm konz. Schwefelsäure) und Natriumnitrit (2,5 g:200 ccm Wasser) zu gleichen Teilen eine intensiv rote Färbung. Die Chloroformlösung schüttelt man erst mit 5 ccm 90%igem Alkohol und setzt dann je 10 Tropfen der erwähnten Lösung zu.

Beurteilung.

Schildbach²⁾ bespricht die Methode abfällig.

20. Bartleys Probe beruht darauf, daß mit Salzsäure angesauerter Harn durch Eisenchlorid grün gefärbt wird, wenn Gallenfarbstoffe vorhanden sind. Indican kann durch Schütteln mit Chloroform entfernt werden.

Eine Reihe in den letzten Jahren empfohlener Proben bringen nichts neues.

Bei der nach dem Zusatz von Ehrlichschem Reagens (Dimethylaminobenzaldehyd S. 489) zu bilirubinhaltigem Harn auftretenden Grünfärbung, der sogenannten grünen Benzaldehydreaktion im Bilirubinarn, handelt es sich nach den von K. Hoesch³⁾ vorgenommenen Untersuchungen um eine Säurenitritreaktion.

Wahl der Methode.

Bei einer Prüfung auf Gallenfarbstoffe wird man stets erst die Gmelinsche Probe 1, auch nach Rosenbach, zu Rate ziehen. Bei negativem Ausfall kann man eine von den anderen Methoden (2, 5, 7, 8) in Anwendung bringen. Man soll sich auch hier nicht auf das Ergebnis einer Probe allein verlassen. Übrigens treten die Reaktionen in den verschiedenen Harnen auch nicht immer gleichmäßig stark und sicher auf; wir müssen bedenken, wie verschieden der Harn zusammengesetzt ist und wie leicht hier eine Beeinflussung der einen oder der anderen Reaktion möglich werden kann.

Zu bemerken ist noch, daß Harn, die nach Einnehmen von Rheum, Santonin oder Senna entleert worden sind, mit ikterischem Harn Ähnlichkeit besitzen. Solcher Harn wird aber auf Zusatz von Alkalien rot und bekommt nach dem Ansäuern seine ursprüngliche Farbe wieder.

Bei verschiedenen Reaktionen macht sich die Entfernung der Gallenfarbstoffe aus dem Harn notwendig; man schüttelt zu diesem Zwecke den angesauerten Harn entweder mit Chloroform oder kocht ihn mit einigen Messerspitzen reiner Tierkohle aus; hierbei ist aber, wie Sahli bemerkt, immer zu bedenken, daß die Kohle auch andere Körper, vielleicht auch diejenigen, auf die zu prüfen ist, aufnehmen könnte; man hat deshalb Kontrollversuche anzustellen.

Quantitative Bestimmung.

1. Bestimmung des Bilirubins nach A. Jolles.⁴⁾

Prinzip.

Bilirubin wird bei Einwirkung alkoholischer Jodlösung in einen grünen Farbstoff übergeführt, wobei auf 1 Mol. Bilirubin annähernd 4 Atome Jod verbraucht werden.

¹⁾ Mercks Ber. 1905. 11; Pharm. Centrbl. 1907. 48. 387.

²⁾ Zentralbl. inn. Mediz. 1905. 26. 1097.

³⁾ Klin. Wochenschr. 1922. I. 2034.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1899. 27. 83.

Nach Jolles wäre die grüne Verbindung Biliverdin; es handelt sich aber nach Thudichum und Munk wohl um ein Substitutionsprodukt und nicht um ein Oxydationsprodukt.

Erforderliche Lösungen.

$\frac{n}{100}$ Hüblsche Jodlösung. $\frac{n}{100}$ Natriumthiosulfatlösung.

Einerseits werden 0,64 g Jod, andererseits 0,8 g Quecksilberchlorid in je 250 ccm 95%igen fuselfreien Alkohols gelöst; letztere Lösung wird, wenn nötig, filtriert; beide Lösungen werden vereinigt. Die Flüssigkeit darf erst nach etwa 10stündigem Stehen in Gebrauch genommen werden. Der Titer der Jodlösung ist immer frisch einzustellen; man bringt 10 ccm der gemischten Jodlösung mit 30 ccm Chloroform, 50 ccm Alkohol, 10 ccm Jodkaliumlösung (1:10) und 100 ccm Wasser in einen Kolben und titriert mit der $\frac{n}{100}$ Thiosulfatlösung nach Zusatz von Stärkelösung; den Titer der Thiosulfatlösung stellt man in der S. 119 angegebenen Weise fest.

Ausführung.

Von gallenfarbstoffreichen Harnen werden 10 ccm, von gallenfarbstoffarmen Harnen 20 ccm genau abgemessen und in einen etwa 200 ccm fassenden Schüttelcylinder gebracht, der am Boden eine birnenförmige Gestalt und ein möglichst kurzes Ausflußrohr besitzt. Zu dem Harn setzt man 20 ccm Chloroform, 10 ccm 10%ige Chlorbariumlösung und 50 ccm Salzsäure (1:5) hinzu, schüttelt das Ganze mehrere Minuten kräftig durch und läßt absetzen. 15 ccm von der Chloroformlösung bringt man in einen geeichten Standcylinder (etwa 25 cm Höhe und 3 cm Weite). Die im Ausflußrohre befindlichen zurückgebliebenen Chloroformtropfen läßt man durch Umkehren des Schüttelcylinders und Öffnen des Hahnes zurückfließen. Man bringt weitere 15 ccm Chloroform in den Schüttelcylinder zum Harn, schüttelt kräftig durch, läßt absetzen und hierauf 12 ccm der Chloroformlösung in den Standcylinder abfließen. Nunmehr setzt man von neuem 10 ccm Chloroform hinzu und läßt nach erfolgtem Schütteln und Absetzen 8 ccm der Chloroformlösung abfließen. Nach diesem Vorgange sind alle Gallenfarbstoffe (alles Bilirubin) extrahiert. Man wäscht den Inhalt des Standcylinders, das Chloroform, zweimal mit etwa 30 ccm Salzsäure (1:1) aus, um mitgerissene Harnbestandteile zu entfernen, wobei man wiederholt schüttelt, und pipettiert oder hebert beidemale 25 ccm der Salzsäure ab. Der Inhalt des Cylinders wird in eine Stöpselflasche gebracht, der Cylinder noch zweimal mit je 25 ccm Alkohol nachgewaschen und diese Waschflüssigkeit der Hauptmenge zugefügt. Nach dem Zusatz von 10 ccm der Hüblschen Jodlösung schüttelt man etwa 5 Minuten öfters durch, setzt 5—10 ccm einer 10%igen Jodkaliumlösung zu, verdünnt mit ungefähr 100 ccm Wasser und titriert mit der $\frac{1}{100}$ Natriumthiosulfatlösung, nachdem man Stärkelösung zugegeben hat, wodurch hier keine Blaufärbung, sondern eine rotbraune Färbung entsteht, unter Umschütteln des Inhaltes der Stöpselflasche, bis die über dem Chloroform stehende rotbraune Flüssigkeit vollkommen entfärbt ist.

1 ccm der $\frac{n}{100}$ Jodlösung = 0,00144 g Bilirubin.

Die zur Verwendung kommende Salzsäure muß chlorfrei, das Jodkalium jodsäurefrei sein.

Beurteilung.

Eine eingehendere Nachprüfung scheint das Verfahren nicht gefunden zu haben.

2. Klinische Methode zur quantitativen Bestimmung der Gallenfarbstoffe nach J. Bouma.¹⁾

Prinzip.

Die Methode beruht auf der Entfernung von Urobilin, auf der Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin und auf der Bestimmung des Biliverdins mit Hilfe von Standardlösungen, die aus normalem Harn mit 10—100 mg Biliverdin im Liter hergestellt sind.²⁾

Ausführung.

10 ccm sauer reagierenden, frischen, klaren, ikterischen Harnes (alkalischer wird mit Essigsäure angesäuert, neutraler wird ohne weiteres mit Chlorcalciumlösung versetzt und zentrifugiert, trüber Harn wird durch ein kleines Filter filtriert und erst das spätere Filtrat, nicht gleich das erste verwendet) mischt man mit 2 ccm 20%iger Chlorcalciumlösung und stumpft die saure Reaktion mit verdünntem Ammoniak tropfenweise bis zur nahezu neutralen Reaktion ab (man sorge, daß diese nicht alkalisch wird). Nun wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, die klare Flüssigkeit, die man auf Urobilin untersuchen kann, abgegossen und der Niederschlag in destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Nachdem wieder zentrifugiert ist, bis der Niederschlag so fest am Boden sitzt, daß man das Waschwasser ganz abgießen kann, wird der Niederschlag in 5 ccm des Reagens (1,5 g festes Eisenchlorid wird in 1 Liter Salzsäure von 1,25 spez. Gewicht gelöst und hiervon 1 ccm mit 4 ccm absolutem Alkohol vermischt) aufgenommen und in ein Proberöhrchen gegossen. Man wartet nun, bis die Farbe mit der der Standardröhrchen (Bili

¹⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1904. 30. 881.

²⁾ Der Apparat mit den Standardröhrchen ist bei D. B. Kagenaar in Utrecht zu haben.

verdin) übereinstimmt, stellt es zwischen die, denen es in der Farbenintensität am meisten gleicht und liest den Gehalt an Gallenfarbstoff direkt ab.

Ist der Gehalt größer als 100 mg, dann verdünnt man den zu untersuchenden Harn mit normalem Harn (nicht mit Wasser, um nicht die für die Fällung notwendigen Phosphate zu verringern) und wiederholt die Probe.

Im Anschlusse an die Prüfung des Harnes auf die Gallenfarbstoffe soll die Prüfung auf Gallensäuren angereicht werden, da diese Prüfung manchmal unmittelbar nach der Probe auf die Gallenfarbstoffe ausgeführt zu werden pflegt.

Die **Gallensäuren** sind amidartige Verbindungen der stickstofffreien Fellin- und Cholalsäuren mit Glykokoll oder mit Taurin, aus denen sich durch Alkalien oder Säuren die freien Säuren herstellen lassen. Die Paarung der Gallensäuren geht ebenfalls in den Leberzellen vor sich. Genaues über die Herkunft der Gallensäuren wissen wir noch nicht; wahrscheinlich stellen sie Abbaustufen des Cholesterins dar (Abderhalden).

Die Gallensäuren kommen selten im Harn vor; nur bei hepatogenem Ikterus werden sie angetroffen und auch da nur in geringer Menge; jedenfalls werden sie nach dem Übergange ins Blut leicht zerstört.

Eigenschaften.

Die Cholalsäure (Cholsäure) $C_{24}H_{40}O_5$ krystallisiert in mikroskopischen Krystallen und ist schwer löslich in Wasser, leichter löslich in Alkohol und in Äther, sehr leicht in Eisessig; sie schmilzt bei 198° und ist optisch aktiv, rechtsdrehend.

Die Fellinsäure $C_{23}H_{38}O_4$ krystallisiert aus Benzol in glänzenden, rechtwinkeligen Täfelchen; sonst krystallisiert sie nur schwer; der Schmelzpunkt der amorphen Säure liegt bei 142° . Die Existenz dieser von Schöten aus Menschengalle hergestellten Säure ist noch nicht sicher. Lassar-Cohn stellte sie auch aus Menschengalle dar.

Glykocholsäure und Taurocholsäure krystallisieren in farblosen Nadeln; sie kommen in der Rinds- und Hundsgalle vor. Beide Säuren drehen rechts; die spezifische Drehung der ersteren beträgt in alkoholischer Lösung $= +29^\circ$, das $[\alpha]_D$ der Taurocholsäure $= 24,5^\circ$.

Die Gallensäuren geben die Pettenkofersche Reaktion und zeigen in alkoholischer Lösung starke Rechtsdrehung.

Die spezifische Drehung $[\alpha]_D$ für die krystallalkoholhaltige Cholsäure beträgt für Lösungen mit 0,5–2,0% nach E. Vahlen $= +31,5^\circ$, für die alkoholfreie $+37,0^\circ$, nach F. Pregl $= +35,1^\circ$.

Nachweis.

Wegen des auch im normalen Harn vorhandenen Indicans und wegen des normalen Vorkommens geringer Mengen von Kohlenhydraten, von höheren Kohlenwasserstoffen und Säuren der Fett- und Benzolreihe, vor allem wegen der meist im Überschusse vorhandenen Gallen- und Harnfarbstoffe, die eine rötliche Färbung bei der M. Pettenkoferschen Reaktion — einer Furfurolreaktion — verursachen können, kann der Nachweis von Gallensäuren im ikterischen Harn nicht direkt erfolgen, er ist fast stets aussichtslos. Man muß daher die Gallensäuren aus dem Harn isolieren und mit den isolierten Gallensäuren die Pettenkofersche Reaktion anstellen. Formaldehyd hindert das Eintreten dieser Reaktion, wohl wegen der Einwirkung auf das Furfurol.

1. Man fällt nach Hoppe-Seyler (Plattner) den eiweißfreien Harn (100–200 ccm) mit Bleiessig und Ammoniak, wäscht den Niederschlag mit Wasser, kocht ihn nach dem Trocknen mehrmals mit absolutem

Alkohol aus und filtriert die heiße Flüssigkeit. Die alkoholische Lösung des gallensauren Bleis verdampft man auf dem Wasserbade mit einigen Tropfen Sodalösung zur Trockene und kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol. Die auf ein kleines Volumen verdunstete Lösung schüttelt man reichlich mit Äther, wodurch die gallensauren Salze zunächst als amorpher Niederschlag gefällt werden; diese verwandeln sich oft nach längerem Stehen in Büschel schöner Krystallnadeln. Man versetzt zur Ausführung der Pettenkoferschen¹⁾ Reaktion die wässrige Lösung dieser Krystalle oder die wässrige Lösung des Verdampfungsrückstandes von der alkoholischen Lösung mit Soda (oben) mit einigen Tropfen Rohrzuckerlösung (1:10) und gibt dann vorsichtig und langsam konzentrierte Schwefelsäure hinzu; man hält die Temperatur auf etwa 60—70°, indem man, wenn nötig, das Reagenzglas in kaltes Wasser hält; es entsteht bei Anwesenheit von Gallensäuren erst eine rote, dann eine sehr schön violettrote Färbung.

Die Probe kann auch als Ringprobe vorgenommen werden.

Die mit Wasser oder Alkohol verdünnte Lösung zeigt im Spektrum einen Streifen zwischen *D* und *E* und einen zweiten vor *F*.

Straßburger läßt einen breiten Papierstreifen in den mit Rohrzucker versetzten Harn eintauchen, trocknen und mit einem Glasstab an mehreren Stellen Schwefelsäuretropfen auftragen. Violette Färbung bei Anwesenheit von Gallensäuren.

Beurteilung.

Die Probe ist nicht ganz einwandfrei. Aceton wirkt störend, d. h. es gibt eine ähnliche Färbung (R. Fritsch).²⁾ Nach Fritsch ist die von Jolles angegebene Reaktion empfehlenswert.

2. Ein von J. Bang und Laurin³⁾ stammendes Verfahren besitzt vor dem eben angegebenen Verfahren den Vorteil der Zeitersparnis und einer besseren Trennung von den Farbstoffen.

Es beruht darauf, daß die Gallensäuren durch Sättigen mit Magnesiumsulfat in saurer Lösung quantitativ gefällt werden. Kommen nur Spuren von Gallensäuren vor, was oft der Fall ist, so tritt jedoch nur eine Opaleszenz und keine deutliche Fällung ein. Setzt man aber einige Tropfen einer Eiweißlösung, z. B. Serum, hinzu, so reißt der Eiweißniederschlag die Gallensäuren mit.

20—50 ccm Harn werden mit 2—3 Tropfen Blutserum versetzt und mit Magnesiumsulfat gesättigt. Nach dem Ansäuern mit 1—2 Tropfen Salzsäure erhitzt man die Mischung bis zum Sieden und filtriert. Wenn der Harn stark gefärbt war, wäscht man den Niederschlag mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung aus, außerdem genügt Trocknen zwischen Fließpapier allein. Schließlich kocht man den Niederschlag mit 10—15 ccm Alkohol, gießt diesen in ein anderes Proberöhrchen, setzt 2—3 Messerspitzen Baryt hinzu und erwärmt wieder bis zum Sieden; nach dem Filtrieren darf die Flüssigkeit nur schwach gelblich gefärbt sein, sonst ist die Barytfällung zu wiederholen. Das Filtrat wird eingedampft und der Rückstand mit 1 Tropfen 1%iger Rohrzuckerlösung und 2—3 ccm konz. Salzsäure versetzt; nach erfolgter Lösung bringt man die Mischung in ein Proberöhrchen und erhitzt. Eine violette Farbenreaktion beweist die Gegenwart von Gallensäuren. Man kann auch mit dem Rückstande die Pettenkofersche Reaktion anstellen.

3. Nach Udránszky⁴⁾ setzt man zu 1 ccm der wässrigen oder alkoholischen Lösung der Gallensäuren 1 Tropfen 0,1%iger wässriger Furfurolösung, läßt dann 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure zufließen und kühlt ab. Es entsteht selbst bei geringen Mengen von Gallensäuren (Cholsäure) eine schöne pfirsichblütenrote Färbung.

¹⁾ Ann. Chem. Pharm. 1844. 52. 90.

²⁾ Zeitschr. analyt. Chem. 1910. 49. 94.

³⁾ J. Bang, a. a. O.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1888. 12. 372.

Die Flüssigkeit zeigt zwei Absorptionsstreifen, einen zwischen *D* und *E*, den anderen vor *F*.

4. Auf die Seite 508 angeführte Methode von Haycraft wird verwiesen.

Der Reaktion liegt eine Erniedrigung der durch gallensaure Salze bewirkten Oberflächenspannung zugrunde. H. Müller¹⁾ macht weitere Angaben; die Schwefelblumen Sulfur. crudum verdienen nach ihm den Vorzug.

Beurteilung.

Diese Methode ist nicht einwandfrei.

5. A. Jolles²⁾ benützt als Reagens zum Nachweis eine 5%ige Rhamnoselösung und konz. Salzsäure. 50 ccm Harn werden mit 15 ccm einer 3%igen Caseinlösung gemischt; man setzt tropfenweise 10%ige Schwefelsäure unter fortwährendem Umschütteln so lange zu, bis das Casein vollkommen ausgefällt ist; es sind etwa 0,6–0,8 ccm nötig. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wird in ein Bechergläschen gebracht und mit 10 ccm absolutem Alkohol 1 Stunde digeriert. Vom Filtrate werden dann 4–5 ccm in einem Reagenzglas mit 1 Tropfen der Rhamnoselösung und mit 4–5 ccm konz. Salzsäure versetzt und nach dem Erhitzen bis zum Kochen 1 Minute im schwachen Kochen erhalten. Nach dem Erkalten fügt man 2 ccm Äther zu und schüttelt um. Bei Anwesenheit von Gallensäuren bemerkt man eine grüne Fluoreszenz. In konzentrierten, indicanreichen, aromatische Oxysäuren reichlicher enthaltenden Harnen ist die Probe weniger empfindlich.
6. K. Inoye und H. Ito³⁾ empfehlen eine Farben- und Spektralreaktion der Gallensäuren mit Vanillin und Schwefelsäure.
7. Dragendorff läßt den mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuerten Harn mit Chloroform etwa 1 Stunde lang schütteln, den Chloroformauszug mit absol. Alkohol versetzen, das Chloroform abfiltrieren und die Lösung verdunsten. Mörner entfernt erst aus dem Harn das Kochsalz durch Dialyse und schüttelt dann den Harn nach dem Ansäuern mit 0,1–0,2%ig. Essigsäure mit Chloroform. Der nach einigen Tagen abgesetzte Niederschlag — das im Harn vorhandene kolloidale Eiweiß mit den eiweißfallenden Substanzen, auch der Taurocholsäure — wird nach dem Abfiltrieren in schwachem Ammoniak gelöst und nochmals, wie angegeben, mit Chloroform nach Essigsäurezugabe gefällt. Der wieder in Ammoniak gelöste Niederschlag wird mit 2–3 Vol. Alkohol versetzt und mit Essigsäure gefällt. Die Taurocholsäure ist im Alkohol gelöst; die alkoholische Lösung wird nach dem Filtrieren neutralisiert, eingedampft, der Rückstand mit starkem Alkohol ausgezogen, die Lösung wieder verdunstet, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und mit Äther gefällt. Der Niederschlag dient zur Anstellung der Pettenkofer'schen Reaktion.

Auf ein von Meillère⁴⁾ angegebenes Verfahren — Bestimmung der Oberflächenspannung — und auf stalagmometrische Untersuchungen über die Gallensalze im Urin von A. Gilbert, F. Chabrol und H. Bénard⁵⁾, A. J. Ignatowsky⁶⁾ sei hingewiesen.

Annähernde quantitative Bestimmung.

Man isoliert aus etwa 50 ccm Harn nach 1. die Gallensäuren. Die alkoholische Lösung derselben wird nötigenfalls noch mit Tierkohle entfärbt und polarisiert. Die spezifische Drehung der Cholsäure ist Seite 510 mitgeteilt. Die spezifische Drehung des glykocholsauren oder taurocholsauren Natrons in Alkohol beträgt + 25,7 (nach F. Letsche + 27,8° bei 13°) oder + 24,5°.

C. Melanin (Phymatorrhusin). Melanogen.

Das Melanin ist kein normaler Harnbestandteil, sondern kommt nur unter pathologischen Verhältnissen, doch ziemlich selten vor — Melanurie.

¹⁾ Schweiz. med. Wochenschr. 1921. 51. 821.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1908. 57. 30.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1908. 57. 313.

⁴⁾ Compt. rend. soc. biol. 1905. 58. 906.

⁵⁾ Ebenda. 1921. 84. 65.

⁶⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1922. 35. 958.

Der Harn von Kranken, die an melanotischen Tumoren leiden, ist entweder gleich nach dem Entleeren dunkel oder nimmt beim Stehen an der Luft von oben nach unten beginnend eine schwarzbraune bis schwarze Färbung an; das Melanin kann sich auch als fester Körper im Sedimente ausscheiden. Im Harn ist das Melanin als Melanogen, das Chromogen des Melanins, das erst durch Oxydation in Melanin übergeführt wird, vorhanden. Nach H. Eppinger¹⁾ sind Melanin und Melanogen durchaus nicht in jedem Falle von Melanosarkom im Harn vorhanden, sondern zumeist nur dann, wenn zahlreiche Metastasen zu finden sind und wenn diese wohl hauptsächlich ihren Sitz in der Leber haben.

Nach Eppinger entsteht das Melanin aus dem Tryptophan; er fand, was auch schon Thormählen mitteilte, daß in vielen Fällen von Melanurie, aber nicht in allen, der Harn mit Nitroprussidnatriumlösung und Kalilauge versetzt eine tief violettrote Färbung zeigt; beim Ansäuern entsteht eine tiefblaue Farbe. Indol gibt jedoch die gleiche Reaktion. Auch positive Diazoreaktion wurde beobachtet; die Rotfärbung trat oft schon ohne Zusatz von Ammoniak ein.

Mit dem Blutfarbstoff hat das Melanin nichts zu tun; nach O. v. Fürth²⁾ dürfte das Wesen der Melaninbildung in der Abspaltung cyklischer Komplexe aus dem Eiweißmolekül und der fermentativen Oxydation richtig erfaßt sein.

Darstellung.

Man fällt den Harn mit essigsaurem Blei, zersetzt den Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff und dampft das Filtrat ein, das dann einen schwarzbraunen Rückstand hinterläßt. Auch kann man den Harn mit Barytwasser fällen und die braungelbe Barytfällung mit Sodalösung behandeln, die die Farbstoffe aufnimmt, die dann durch Übersättigen der Lösung mit Schwefelsäure ausgeschieden werden. Durch wiederholtes Auflösen in verdünnter Lauge und Füllen mit Essigsäure erhält man die Farbstoffe reiner; einheitliche Substanzen sind diese Farbstoffe aber nicht.

Adler³⁾ kocht den Bleisulfidniederschlag mit Alkohol und Pyridin aus und behandelt den Niederschlag zum Lösen des Melanins mit Natronlauge; dieses fällt man mit Salzsäure und reinigt es durch Zentrifugieren. Eppinger hat zur Isolierung des Melanogens den Harn mit einer 10% Schwefelsäure enthaltenden 10%igen Quecksilberoxydsulfatlösung ausgefällt, den Niederschlag, der mehrmals mit frischer schwefelsaurer Quecksilbersulfatlösung gewaschen war, nach dem Trocknen auf Tonplatten in Wasser verteilt, mit aufgeschwemmtem Bariumcarbonat versetzt, bis Kongopapier nicht mehr gebläut wurde und dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt; dieser wurde durch Kohlensäure entfernt und das Filtrat im Vakuum unter Durchleiten von Wasserstoffgas konzentriert; mit der konz. Lösung wurden die Reaktionen angestellt. Es ist zweckmäßig, die Reinigung in der angegebenen Weise zu

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1910. 28. 181.

²⁾ Probleme der physiol. u. patholog. Chem. F. C. W. Vogel, Leipzig 1912.

³⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1910. 36. 1890.

wiederholen; man erhält schließlich nach dem Eindampfen Krystalle. Eppinger stellte noch weitere Reinigungsversuche an, er fand, daß wohl eine N-Methylpyrrolidinoxycarbonsäure vorhanden ist.

Nachweis.

1. Beim Ansäuern von Harn mit verdünnter Schwefelsäure und nach dem Zusatze von Eisenchlorid (v. Jaksch), oder von Kaliumdichromatlösung zum Harne oder mit Salpetersäure (Eiselt) behandelt, entsteht bei Anwesenheit von Melanin dunkle Färbung. Durch Reduktionsmittel (Zinkstaub und Salzsäure) wird wieder Entfärbung bewirkt.

O. Adler¹⁾ schüttelt den aus Harn (100 ccm + 1 Tropfen Essigsäure) mit neutraler Bleiacetatlösung erhaltenen und mit verdünnter Bleiacetatlösung gewaschenen Bleiniederschlag mit Wasser, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, treibt diesen durch einen Luftstrom im Filtrate aus und versetzt dann 2 ccm des Filtrates mit 1 Tropfen Ferri-chlorid, 3 ccm Eisessig und 1–2 ccm konz. Schwefelsäure. Es tritt Violettfärbung ein. Spektroskopisch zeigt das Filtrat ein Band an der D-Linie.

2. Beim Zusatze von Bromwasser und Schwefelsäure (Zeller) oder von Chlorwasser tritt auch eine Färbung ein; ein Überschuß von Brom- oder Chlorwasser entfärbt den Harn, wobei sich ein dichter, schmutziggelber Niederschlag absetzt.

Eigenschaften.

Das Melanin ist ziemlich resistent gegen Säuren und Alkalien, durch Bleiessig, nicht durch neutrales Bleiacetat, wird es aus seinen Lösungen gefällt.

D. Leubes Farbstoff.

Aus einem pathologischen, dunkelvioletten gewordenen Harne wurde der Farbstoff durch Äther isoliert, der ihn mit der gleichen Farbe aufnahm. In Alkali war der Farbstoff löslich (Unterschied vom Indigorot). Die alkoholische Lösung wurde durch Zinkstaub entfärbt, an der Luft aber wieder violett.

E. Thormälens²⁾ Farbstoff.

Dieser Farbstoff wurde im Harne einer an Leber- und Milztumor Leidenden und in drei anderen sehr indicanreichen Harnen vorgefunden. Der Harn war dunkelbraun, bei der Indicanprobe trat starke Rotfärbung auf; die Legalsche Acetonprobe (S. 112) ergab nach dem Ansäuern mit Essigsäure sehr schöne Blaufärbung. Aus dem Bleiessigniederschlag erhielt man die Substanz nach dem Zersetzen mit Natriumcarbonat. Sie löste sich in Alkohol, Glycerin, nicht in Chloroform, Benzol, wenig in heißem Äther.

Nach L. C. Maillard sind die von Leube, J. Thormälens, Otto Brieger, Mester u. a. beschriebenen Farbstoffe jedenfalls unreine, zum Teil Indirubin enthaltende Produkte; diese Ansicht Maillards wird auch von Porcher und Hervieux bestätigt.

III. Harnfarbstoffe, durch Einwirkung von Arzneien gebildet (S. 5 und bei Arzneien).

¹⁾ Zeitschr. f. Krebsforsch. 1912. 11. 1; Chem. Centralbl. 1912. 83. 840.

²⁾ Virchows Archiv 1887. 108. 313.