Aus dem Rigshospital Abteilung A in Kopenhagen.
(Direktor: Prof. Dr. Grand.)

Ueber die Anwendbarkeit von Anilinfarben als Reagens auf Gallenfarbstoff im Harn.

Von Priv.-Doz. Otto V. C. E. Petersen, I. Assistenten.

Obgleich Methylviolett in wäßriger Lösung recht allgemein als Reagens auf Gallenfarbstoff im Harn angewendet wird, findet man dies Verfahren in den größeren Handbüchern nicht erwähnt, und es sind elf Jahre verflossen, seitdem in der dänischen Literatur Neermann in der „Hospitalstidende“ in einer Mitteilung aus dem Kgl. Frederiks Hospital, Abt. A, etwas darüber veröffentlichte. Neermann teilt hier mit, daß das Verfahren ursprünglich aus Frankreich stammt und in „La médecine moderne“ von 1892 erwähnt sein soll; in Dänemark sei es zuerst in dem nämlichen Jahre aufgekommen und in „Medicinsk Selskabs Forhandling“ besprochen worden; das Verfahren und seine Fehlerquellen, namentlich bezüglich des Urobilins, wurden 1895 von Prof. K. Faber in einem Aufsatz in „Hospitalstidende“ behandelt.

Neermann verwendet eine wäßrige Lösung von Methylviolett (1 : 200); die Reaktion wird etwas unbestimmt beschrieben: „man nimmt ein paar Kubikzentimeter dieser Lösung und fügt Harn hinzu.“ Uebrigens vergleicht Neermann die Methylviolettprobe mit der Jodätherprobe und mit der Hammarstenschens, und zwar mit dem Resultat, daß die Methylviolettprobe empfindlicher ist als die übrigen Proben. Auch Neermann hebt das Urobilin als Fehlerquelle hervor. Das Jahr 1909 brachte einen Aufsatz von Torday und Klier¹⁾; sie hatten selbstständig entdeckt, daß Methylviolett mit Gallenfarbstoff eine rote Farbe ergibt, und untersuchten eine Reihe Anilinfarblösungen (Azurblau, Giemsa'sche Lösung, May-Grünwalds Lösung, Methylviolett, Pyronin etc.). Sie fanden, daß diese blauen oder bläulichen Farben Farbenveränderung mit Gallenfarbstoff ergeben. Ein Vergleich mit Marshalls und Gmelins Reaktionen ergab, daß die Farbenreaktionen feiner sind als die genannten. Torday und Klier empfehlen besonders Methylenblau 1 : 10 000; zu 10 ccm davon wird 0,5—1 ccm Harn hinzugefügt, und bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff wird die blaue Farbe in Grün verändert. Was die Natur der Reaktion betrifft, so glaubten sie, daß es sich hier kaum um eine reine Farbmischung, vielmehr um eine Metachromasie handle.

Im Herbst 1910 begann ich Torday-Kliers Reaktion zu prüfen, und obgleich sie zu Anfang einen empfindlichen und zuverlässigen Eindruck machte, zeigten sich bald so viele Abweichungen, namentlich in bezug auf positive Reaktion der nicht gallenhaltigen Harn, daß die Zuverlässigkeit mir verdächtig wurde.

Um diese Verhältnisse genauer aufzuklären, unternahm ich eine Reihe von Versuchen teils mit gallenfarbstoffhaltigem, teils mit nicht gallenfarbstoffhaltigem Harn. Es zeigte sich nun, daß 20 ccm eines stark gallenfarbstoffhaltigen Harnes bei Zusatz von 2 ccm Reagens (1 : 5000) Grünfärbung ergab, und zwar nicht nur mit blauen Anilinfarben (Methylenblau, Nilblau), sondern auch mit Farbstofflösungen, die den Anilinfarben fernstehen, wie Berlinerblau und Indigokarmin; es kann also von keiner chemischen Verbindung bei der Reaktion die Rede sein. Zugleich zeigte sich bei Versuchen mit Harnen, die keinen Gallenfarbstoff enthielten, daß auch sie Grünfärbung mit blauen Farblösungen ergaben. So wurden 20 ccm eines strohgelben Harns grün bei Zusatz von 2 ccm Reagens, blaue bei Zusatz von 3 ccm. Ein dunklerer Harn (stark rotgelb) gab noch grüne Farbe bei Zusatz von 3 ccm Reagens zu 20 ccm, blaue Farbe bei 4 ccm. Der Sachverhalt wird gut aufgeklärt durch folgenden Versuch:

Zu 20 ccm von vier verschiedenfarbigen Harnen, die alle gallenfarbstofffrei waren, wurde Reagens in zunehmenden Quantitäten, wie unten ausgeführt, hinzugefügt.

¹⁾ Deutsche medizinische Wochenschrift 1909, No. 34, S. 1470.

20 ccm Harn + Reagens ccm	bleich- gelb	hellstroh- gelb	gelb	gelbrot
1 —	—	—	+ schwach	+ stark
2 —	—	—	—	+ recht stark
3 —	—	—	—	+ schwächer
4 —	—	—	—	—
5 —	—	—	—	—
6 —	—	—	—	—
7 —	—	—	—	—
8 —	—	—	—	—

Daraus geht deutlich hervor, daß jeder stark gefärbte Harn bei angemessenem Zusatz die vermeintliche Reaktion auf Gallenfarbstoff geben kann und daß die Stärke der Reaktion im Verhältnis zur angewendeten Harnmenge zunimmt. Bei einer andern Reihe von Versuchen zeigte es sich, daß die angewandten Reagentien grüne Farbe ergaben, bei Zusatz von gelösten gelben Farbstoffen (z. B. Pikrinsäure, Tropäolin oo, Bismarckbraun u. a. m.), und schließlich, daß man dieselbe grüne Farbe erhielt, wenn man zwei Kuvetten, eine mit blauer und eine mit gelber Farblösung, voreinander hielt. Die „Reaktion“ ist also ausschließlich eine optische Reaktion auf gelben Farbstoff und hat mit der Chemie nichts zu schaffen. So erhält man eine prächtige Reaktion auf gelben Gallenfarbstoff, wenn man ein Glas mit Fehlingscher Lösung vor ein Glas mit gallenfarbigem Harn hält. Die angeführten Verhältnisse gelten außer für die blauen Farben auch für Methylviolett. Bei diesen Versuchen habe ich Harn in Ueberschuß angewendet und kleinere Mengen von Reagens hinzugefügt; es fragt sich nun, ob die Reaktion zuverlässig ist, wenn man kleinere Mengen von Harn (1—3 ccm) mit größeren Mengen von Farbstofflösungen mischt, und ob es denkbar ist, daß der Gallenfarbstoff optisch betrachtet die übrigen Farbstoffe des Harns in dem Maße überwiegt, daß die in der Weise ausgeführte Reaktion ebenso empfindlich ist wie die übrigen chemischen Reaktionen. Ich benutzte hierzu eine Farblösung 1 : 10 000 und fügte zu 10 ccm davon zunehmende Mengen vom Harn, indem ich gleichzeitig Kontrolluntersuchungen mit Marshalls und Hammarstens Probe, sowie durch Spektroskopie des Harnes anstellte.

1. Marshall, Hammarsten und Spektroskopie: starke Gallenfarbstoffreaktion.

10 ccm Reagens Methyleneblau + Harn, ccm

$\frac{1}{2}$:	2 :
1 „	$2\frac{1}{4}$ +

mit Methylviolett trat die Reaktion bei demselben Harn bei Zusatz von 2 ccm ein.

2. Derselbe Harn + gleiche Teile Wasser. Hammarsten, Marshall und Spektroskopie: positive Reaktion.

10 ccm Methyleneblau + Harn, ccm

3 :	$5\frac{1}{4}$ +
4 „	6 „
5 „	—

Mit Methylviolett trat die Reaktion bei Zusatz von $7\frac{1}{2}$ und 8 ccm Harn ein.

3. Derselbe Harn + 3 Teile Wasser; + Spektroskopie: Marshall + Hammarsten.

10 ccm Methyleneblau + Harn, ccm

9 :	11 +
10 „	12 „

Mit Methylviolett trat die Reaktion bei Zusatz von 15 und 16 ccm ein.

4. Derselbe Harn + 4 Teile Wasser; + Marshall + Spektroskopie + Hammarsten.

10 ccm Methyleneblau + Harn, ccm

14 :	15 +	16 +
------	------	------

Mit Methylviolett trat die Reaktion bei Zusatz von 19 und 20 ccm ein.

5. Derselbe Harn + 5 Teile Wasser; + Marshall + Spektroskopie + Hammarsten.

10 ccm Methyleneblau + Harn, ccm

22 :	24 +
23 +	25 +

Mit Methylviolett trat die Reaktion bei Zusatz von 26 und 27 ccm ein.

Man sieht also, daß zum Hervorrufen der Gallenfarbstoffreaktion auch bei einer so schwachen Farblösung wie die hier angewandte, die als besonders empfindlich zu betrachten ist, bei kleinen Mengen Gallenfarbstoff unverhältnismäßig große Harnmengen erforderlich sind, und eben dieses ist die schwache Seite der Reaktion. Ein aus anderen Gründen stark gefärbter Harn, der weder Gallenfarbstoff noch Urobilin enthielt, mit den drei angeführten Kontrollreaktionen geprüft, ergab positive Reaktion bei Zusatz von 10 ccm zur Methylviolettlösung und bei Zusatz von 7 ccm zur Methyleneblaulösung, also bei etwa halb so großer Harnmenge, wie zum Hervorrufen der Gallenfarbstoffreaktion in einem gallenarmen Harn erforderlich. Wenn ein solcher Harn zugleich Gallenfarbstoff in geringer Menge enthält, würde dies ja überschen werden, und andererseits werden viele konzentrierte Harns, wenn man die Reaktion so „fein“ wie möglich ausführt, positive Gallenfarbstoffreaktion ergeben. Ein treffendes Beispiel hiervon fand ich, indem ich den in den erwähnten Versuchen angewandten Harn mit gleichen Teilen des zuletzt angeführten, stark gefärbten, aber gallenfreien Harns verdünnte; während die Reaktion bei Verdünnung mit Wasser bei Zusatz von $5\frac{1}{2}$ ccm Methyleneblau und

$7\frac{1}{2}$ ccm Methylviolett eintrat, fand sich hier deutliche Reaktion bei 3 und $3\frac{1}{2}$ ccm Zusatz, sodaß die Mischung einen weit größeren Gehalt an Gallenfarbstoff vortäuschte, als den tatsächlichen Verhältnissen entsprach, und dies Mehr beruht ausschließlich auf den normalen Bestandteilen des Harns.¹⁾

Aus dem Angeführten scheint hervorzugehen, daß die genannten Anilinfarben zwar als grobe und vorläufige optische Reagentien auf Gallenfarbstoff benutzt werden können, an Feinheit aber den chemischen Proben, wie Marshalls und namentlich Hammarstens Reaktion, bei weitem nicht gleichkommen. Die Aufgabe, die sich die Reaktion stellt, eine gelöste gelbe Substanz in einer gelben Flüssigkeit durch die Eigenschaft gelb nachzuweisen, ist ja auch ziemlich unlösbar. Diese Tatsache bewirkt auch, daß die Reaktion nur bei Zusatz von kleinen Mengen von Harn Bedeutung haben kann; fügt man größere Mengen hinzu, so läßt sich durchaus nicht sagen, ob die Farbstoffveränderung nicht auf dem normalen Farbstoff des Harns beruht, im Gegensatz z. B. zu Hammarstens Fällungsprobe, wo die Stärke der Reaktion der angewandten Harnmenge entspricht. Zum Nachweis von kleinen Quantitäten Gallenfarbstoff können nur Marshalls und Hammarstens Methoden mit Erfolg benutzt werden; letztere ist in der Form, wo man den Gallenfarbstoff mit Chlorbaryum fällt, den Niederschlag zentrifugiert und mit dem Reagens ausschüttelt, ganz außerordentlich empfindlich.

Will man endlich Anilinfarben zur vorläufigen Gallenfarbstoffreaktion benutzen, so ist Methylenblau oder Nilblau vorzuziehen; teils sind sie empfindlicher als Methylviolett (vgl. oben), teils läßt sich der Farbenwechsel von blau in grün leichter beobachten — auch bei künstlichem Licht — als derjenige von violett in rot. Die Reaktion wird bis auf einen gewissen Punkt empfindlicher, je dünner die angewandte Farbstofflösung ist; eine Verdünnung wie die von Torday und Klier angewandte, 1 : 10 000 hat eine angemessene Stärke und ist aus einer Stammlösung 1 : 200 leicht herzustellen.