

# Ueber den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harn.

Von

**Dr. Adolf Jolles** in Wien.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. Max und Dr. Adolf Jolles  
in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 20. October 1893.)

Die physiologisch-chemische Literatur zeigt an Arbeiten über den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harn einen grossen Reichthum und noch immer werden Vorschläge zur Auffindung dieser Gallenbestandtheile im Harn gemacht, wie die vor Kurzem publicirten Methoden von O. Rosenbach<sup>1)</sup> und H. Rosin<sup>2)</sup> beweisen.

Rosenbach hat bekanntlich bereits im Jahre 1876 eine beachtenswerthe Modification der Gmelin'schen Gallenfarbstoffprobe empfohlen, und man musste annehmen, dass die neuerdings empfohlene Probe sich durch grössere Empfindlichkeit auszeichnet.

Rosin bezeichnet in der citirten Abhandlung seine Probe als «eine sehr empfindliche», ohne jedoch darüber Aufschluss zu geben, ob die älteren bekannten Proben an Empfindlichkeit der seinigen nachstehen und inwieweit diese die Grenze der Empfindlichkeit zu erweitern geeignet ist.

Leider finden wir in der Literatur überhaupt fast gar keine positiven Daten über die Empfindlichkeit der Proben.

<sup>1)</sup> Deutsche, medicinische Wochenschrift, 1892, Nr. 17.

<sup>2)</sup> Berliner klin. Wochenschrift, 1893, S. 106.

Ich machte es mir daher zur Aufgabe, die zahlreichen, bisher in Vorschlag gebrachten Methoden auf ihre Empfindlichkeit und Eignung zum Nachweise von Gallenfarbstoffen im Harn zu prüfen.

Zu diesem Zwecke habe ich die bisher in Vorschlag gebrachten Proben auf ihre Empfindlichkeit geprüft, indem ich zu abgemessenen Mengen normalen Harnes abgemessene Mengen frischer Ochsen-galle hinzufügte.

Alle Versuche sind ceteris paribus unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und auch der verwendete normale Harn von denselben Personen — den Assistenten des Laboratoriums — entnommen worden.

Die im Maximum zugefügte Gallenmenge betrug 10%, d. h. zu je 100 ccm. normalen Harn wurden stets 10 ccm.

## Empfindlichkeits-

Gallenfarbstoff- Proben.		Literatur.
1. Gmelin'sche Probe.	Ueberschichtung eines icterischen Harnes mit Salpetersäure.	
2. Modification von Brücke.	Zusatz verdünnter ausgekochter Salpetersäure und dann conc. Schwefelsäure.	Siehe in Anleitung zur Harnanalyse von F. Loebisch, II. Auflage, S. 338.
3. Modification von Vitali.	Hinzufügen einiger Tropfen Kaliumnitritlösung und hierauf etwas verdünnter Schwefelsäure.	Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie 1873, S. 149.
4. Modification von Masset.	M. wendet statt Nitritlösung festes Salz an, das er jedoch erst nach erfolgtem Zusetzen der Schwefelsäure zu dem Harn hinzufügt.	Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. 19, S. 255.
5. Modification von Fleischl.	Nach F. wird der Harn mit dem gleichen Volumen einer concentrirten Lösung von salpetrigsaurem Natron vermischt und concentrirte Schwefelsäure — ohne zu mischen — mit einer Pipette auf dem Boden des Reagensglases gebracht.	Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. 15, S. 502.

Ochsen-galle hinzugefügt, dann der Harn sorgfältig umgeschüttelt und mit demselben die Proben durchgeführt.

Die Verwendung von grösseren Gallenmengen habe ich aus dem Grunde für überflüssig erachtet, weil Proben, die im Harn mit 10% Galle den entsprechenden Gallenfarbstoff-Gehalt nicht sicher nachweisen lassen, die Bezeichnung als «Gallenfarbstoffprobe» nicht mehr verdienen.

Zur Prüfung der Proben wurde stets auf je 100 ccm. normalen Harn 10, 7.5, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1 ccm. frische Ochsen-galle zugefügt und mit diesen gallenfarbstoffhaltigen Harnen die einzelnen Proben durchgeführt.

Bei jeder Probe sind 3 Controlproben gemacht worden.

Die nachstehende Tabelle gibt die relative Empfindlichkeitsgrenze der erwähnten Gallenfarbstoffproben an.

## Tabelle.

10%	7.5%	5%	4%	3%	2%	1.5%	1%	0.5%
positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
positiv	negativ	—	—	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—

Gallenfarbstoff: Proben.		Literatur.	10%	7,5%	5%	4%	3%	2%	1,5%	1%	0,5%
6.	Modification von Rosenbach.	Man filtrirt den Harn und prüft auf der Innenseite mit salpetrige Säure enthaltender Salpetersäure.	Centralblatt für die medicin. Wissenschaften 1876, S. 5.	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—
7.	Modification von Dragendorff.	Statt des Filters nach Rosenbach schlägt D. eine poröse Thonplatte vor.	Siehe Deubner's vergleichende Untersuchung über die neueren Methoden zum Nachweise des Gallenfarbstoffes im Harn icterischer Inaugural-Dissertation 1875. Doct. pat.	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—
8.	Probe von Uitzmann.	10 ccm. Harn werden mit 3—4 ccm. Kalilauge (1:3) umgeschüttelt und mit reiner Salzsäure übersättigt.	Wiener medicin. Presse Nr. 32, 1877.	negativ	—	—	—	—	—	—	—
9.	Probe von Marchal.	Man fügt 2 oder 3 Tropfen Jodtinctur in einen sauren oder neutralen Harn — es resultirt eine smaragdgrüne Farbe.	Zeitschrift für analytische Chemie Bd. 8, 1869.	positiv	positiv	negativ	—	—	—	—	—
10.	Probe von Smith.	Anstatt zu mischen, schlug W. G. Smith vor, einige Tropfen Jodtinctur vorsichtig auf den Harn fließen zu lassen, wobei die Grenzschicht sich schön grün färbt.	Durch: Analyse des Harnes von Neubauer und Vogel, VIII. Auflage, bearbeitet von Huppert, S. 152.	positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—
11.	Probe von Gerhard.	G. schüttelt den Chloroformauszug des icterischen Harns mit sehr verdünnter Jodjodkaliumlösung, wobei nur so wenig Jod verwendet werden darf, dass sich das Chloroform kaum roth färbt; setzt man etwas Kalilauge hinzu, so entfärbt sich das Chloroform und die Kalilauge wird grün.	Sitzungsberichte der Würzburg-physikalisch-medicinischen Gesellschaft Nr. 2.	kaum wahrnehmbar	negativ	—	—	—	—	—	—
12.	Probe von Rosin.	Man füllt etwas von dem zu untersuchenden Harn in ein Reagensglas und giesst etwa 2—3 ccm. verdünnte Jodtinctur so vorsichtig in das ganz schräg gehaltene Reagensglas, welches den Harn enthält, dass die verdünnte Jodtinctur den Harn überschichtet. Sofort oder nach einer Minute tritt an der Grenzschicht zwischen Harn und Jodtinctur ein grasgrüner Ring auf.	Berliner klinische Wochenschrift 1893, S. 106.	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—

Gallenfarbstoff- Proben.		Literatur	7,5 <sup>o</sup> o	5 <sup>o</sup> o	4 <sup>o</sup> o	3 <sup>o</sup> o	2 <sup>o</sup> o	1,5 <sup>o</sup> o	1 <sup>o</sup> o	0,5 <sup>o</sup> o
13. Probe von H. Capranica.	Man versetzt den Harn nach vorangegangener Ansäuerung mit Aether und Chloroform (1:1), decantirt und prüft dann die Farbenreactionen durch Zusatz von Brom. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoffen smaragdgrüne Farbe.	Deutsche medicinische Zeitung 1881. Durch: Pharmaceutische Centralhalle, Bd. XXI S. 456.	negativ	—	—	—	—	—	—	—
14. Probe von Rosenbach.	Durch vorsichtigen Zusatz einiger Tropfen einer 5procentigen Chromsäure-Lösung soll sich gallenfarbstoffhaltiger Harn grün färben. Mehrzusatz ist zu vermeiden, da sich sonst die Flüssigkeit braunroth färbt.	Deutsche medicinische Wochenschrift 1892, S. 1.	negativ	—	—	—	—	—	—	—
15. Probe von Huppert.	8—10 chem. Harn werden mit Kalkmilch gefällt, der Niederschlag abfiltrirt, mit schwefelsäurehaltigem Alkohol in ein Reagenzglas gekühlt und die saure Flüssigkeit, in der der Niederschlag enthalten ist, zum Sieden erhitzt. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoff nimmt die Flüssigkeit eine grüne bis blaue Farbe an.	Archiv für Hekunde, Bd. 8, S. 476, 1887.	positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—
16. Probe von Hoppe-Seyley.	Der Harn wird mit Kalkmilch gefällt, Kohlensäure zur Ausfällung des Kalkes eingeleitet, der Niederschlag abfiltrirt und mit Wasser gewaschen. Lässt man zum Kalkmilchniederschlag auf den Filter mässig verdünnte salpetrige Säure enthaltende Salpetersäure fließen, so entsteht die bekannte Farbenskala	Handbuch der physikal. und patholog.-chem. Analyse von Feilchenfeldt, Hoppe-Seyley 1893, S. 229.	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—
17. Probe von Hilger.	Man versetzt den gelinde erwärmten Harn mit Ba(OH) <sub>2</sub> bis zur alkalischen Reaction. Der abfiltrirte Niederschlag wird ausgewaschen und dann zu einer kleinen Probe des Niederschlages salpetrige Säure enthaltende Salpetersäure zugesetzt. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoffen sollen die bekannten Farbenreactionen entstehen.	Archiv der Pharmacie, Durch: Pharmaceut. Centralhalle, Bd. XI S. 377.	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—
18. Probe von Lewin.	L. schlägt vor, den Harn zur Ausscheidung von harnsauren Salzen stark abzukühlen, letztere nach dem Sammeln auf einem Filter und Auswaschen in heissem Wasser zu lösen und mit dieser Lösung die Reaction anzustellen.	Centralblatt für medicinische Wissenschaft 1881, S. 81.	negativ	—	—	—	—	—	—	—

Gallenfarbstoff- Proben.		Literatur
19. Probe von Ehrlich.	Der Harn wird mit dem gleichen Volumen verdünnter Essigsäure versetzt, und dann tropfenweise folgendes Reagens hinzugefügt, das im Liter enthält: 1 gr. Sulfanilsäure, 15 ccm. Salzsäure und 0,1 gr. Natriumnitrit. Die entstehende dunkle Farbe geht auf Zusatz von Säure, am besten von Eisessig, in das für die Anwesenheit von Bilirubin charakteristische Violett über.	Centralblatt für nische Medicin S. 721, 1883. u. Charité - Annal 11. S. 139, 188
20. Chloroform- Probe und hier- auf Salpeter- säure - Nieder- schlag.	Ausschüttelung des gallenfarbstoffhaltigen Harnes mit Chloroform und Ueberschichtung der Chloroformlösung mit Salpersäure, die etwas salpetrige Säure enthält.	

Fassen wir die Ergebnisse der Tabelle ins Auge, so resultirt zunächst, dass eine Reihe von Gallenfarbstoffproben nicht einmal in mit 10% Galle versetzten Harnen den Gallenfarbstoff nachzuweisen vermögen.

Hierher gehören die Proben von: Uitzmann, Capranica, Lewin, Ehrlich und Rosenbach.

Mit der Probe des Letzteren ist, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, die vor Kurzem in Vorschlag gebrachte Chromsäureprobe gemeint, welche jedoch als zu wenig empfindlich ausserhalb der Reihe der Gallenfarbstoffproben zu setzen ist.

Auffallenderweise wird diese unzuverlässige Probe zum Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harn in dem neuesten Leitfaden von Lenhartz<sup>1)</sup> vorgeschlagen.

Die unterste Grenze der bekanntesten und wohl am meisten angewendeten Probe von Gmelin liegt bei 5%, d. h. mit anderen Worten: Wenn wir die 24stündige Harnmenge mit 1500 ccm. annehmen, so kann in dieser Menge

<sup>1)</sup> Mikroskopie und Chemie am Krankenbett von H. Lenhartz Berlin 1893. Verlag von Julius Springer.

	7,5%	5%	4%	3%	2%	1,5%	1%	0,5%
negativ	—	—	—	—	—	—	—	—
negativ	Farben- ringe kaum sicht- bar.	negativ	—	—	—	—	—	—

so viel Gallenfarbstoff enthalten sein, als in 60 ccm. reiner Galle, trotzdem sind wir mittelst der Gmelin'schen Probe nicht im Stande, diesen Gallenfarbstoffgehalt zu constatiren.

Interessant ist, dass die vorgeschlagenen Modificationen der Gmelin'schen Probe, nämlich die von Brücke, Vitali, Masset, Fleischl und Draggendorff weniger empfindlich sind, als die ursprüngliche Probe von Gmelin. Nur die wegen ihrer bequemen Ausführung beachtenswerthe Rosenbach'sche Modification hat dieselbe Empfindlichkeitsgrenze wie die Gmelin'sche Probe; nichtsdestoweniger gehört sie — wie die Tabelle zeigt — ebenfalls in die Reihe der wenig empfindlichen Proben.

Weiterhin geht aus der Tabelle hervor, dass die Smith'sche Probe, auf die neuerdings Rosin aufmerksam gemacht hat, ihre unterste Grenze bei 3% hat. Dieselbe Empfindlichkeitsgrenze hat also auch die sogenannte Rosin'sche Modification, ferner die Hoppe-Seyler- und Hilger'sche Probe. Demnach verdient die von Rosin empfohlene Probe keineswegs das Prädicat «äusserst empfindlich».

Sie steht an Empfindlichkeit sogar der Huppert'schen Probe nach, die unter den bisher vorgeschlagenen Proben als die empfindlichste bezeichnet werden muss. Ihre unterste Grenze liegt bei 2%, d. h. es kann in der Harnausscheidung pro die — letztere mit 1500 ccm. angenommen — so viel Gallenfarbstoff enthalten sein, als in 22,5 ccm. reiner Ochsen-galle vorhanden ist, und wir sind mittelst dieser empfindlichsten Probe nicht im Stande, diesen Gehalt an Gallenfarbstoff mit Sicherheit zu constatiren.

Diese Thatsache veranlasste mich nun, eine Reihe von Versuchen zu dem Zwecke anzustellen, um eine Probe ausfindig zu machen, vermöge welcher auch in Harnen mit unter 0,1% Galle der entsprechende Gallenfarbstoffgehalt constatirt werden kann.

Zwei Momente waren es, die bei den Versuchen insbesondere berücksichtigt werden mussten:

1. Die möglichst vollständige Isolirung des in der Harnprobe enthaltenen Gallenfarbstoffes.

2. Die Fällung des isolirten Gallenfarbstoffes auf einer möglichst kleinen Fläche, resp. in einem möglichst kleinen Volumen.

Dass Chloroform den Gallenfarbstoff aus dem Harn aufnimmt, ist eine bekannte Thatsache. Aber vergleichende Untersuchungen haben ergeben, dass beim kräftigen Schütteln einer Harnprobe mit Chloroform nur ein verhältnissmässig geringer Theil des Gallenfarbstoffes extrahirt wird, und dass verhältnissmässig bedeutende Chloroformmengen — in mehreren Portionen — erforderlich sind, um aus einer Harnprobe den Gallenfarbstoff möglichst vollständig zu extrahiren.

Gleichzeitig haben vergleichende Untersuchungen ergeben, dass durch Combination von Extraction und Fällung, d. h. durch Behandlung einer Harnprobe mit Chloroform und einem geeigneten Fällungsmittel der Gallenfarbstoff unter gleichen Verhältnissen am vollständigsten aus dem Harn extrahirt wird.

Wie die Huppert'sche und Hilger'sche Probe beweist, sind Kalk- und Barytwasser ganz geeignete Fällungsmittel:

für unsere Zwecke konnte jedoch die Kalkmilch, ebensowenig wie das Barythydrat in Betracht kommen, weil die durch diese Reagentien im Harn hervorgerufenen Niederschläge zu voluminös sind. Auch die gleichzeitige Verwendung von Chlorbaryum und Schwefelsäure, welche als gute Fällungsmittel für Gallenfarbstoff bezeichnet werden können, erwies sich wegen der zu umfangreichen Niederschlagsmenge als unzweckmässig. Hingegen hat sich der blosse Zusatz von Chlorbaryum in jeder Hinsicht bewährt.

Meine Versuche lehrten, dass man, wenn Harn und zwar am besten 50 ccm. — nach vorangegangener Ansäuerung mit einigen Tropfen verd. Salzsäure, mit Chlorbaryum in geringem Ueberschuss und dann mit Chloroform — ca. 5 ccm, — versetzt und hierauf 3—4 Minuten kräftig geschüttelt wird, das Maximum an Gallenfarbstoff dem zu prüfenden Harn durch das Chloroform und den Niederschlag zu entziehen vermag. Ueberdies ist der Niederschlag verhältnissmässig gering, nachdem nur die präformirte Schwefelsäure gefällt wird. Wird das Chloroform und der Niederschlag abpipetirt, filtrirt und auf die Innenfläche des Filters einige Tropfen Salpetersäure getropft — also kurz die Rosenbach'sche Reaction ausgeführt —, so entstehen die bekannten Farben-Reactionen und zwar je weiter dem engeren Ende des Filters zu, desto schöner.

Die unterste Grenze dieses Verfahrens liegt bei 1% oder mit anderen Worten: wir haben durch unser Verfahren die Rosenbach'sche Reaction, deren unterste Grenze bei 5% liegt, bis auf 1% empfindlicher gestaltet.

Aber dieses Ergebniss befriedigte mich noch nicht, und zwar führte ich die noch nicht hinreichende Empfindlichkeit der Probe darauf zurück, dass der Gallenfarbstoff noch immer in einem zu grossen Volumen vertheilt ist und überdies auf dem Filter die Salpetersäure auf eine verhältnissmässig sehr geringe Gallenfarbstoffmenge einwirkt. Auch unsere Ueberschichtungsversuche mit Jodtinctur haben kein befriedigendes Ergebniss geliefert. Wir sind aus diesem Grunde in der Weise vorgegangen, dass wir das Chloroform und den Niederschlag

in ein Reagensglas abpipetirt und das letztere in ein Wasserbad von einer Temperatur von ca. 70 bis 80° hineingestellt haben.

Bereits nach 5 bis 10 Minuten ist das Chloroform verdunstet, worauf dann das Reagensglas herausgenommen und ca. 5 Minuten ruhig zum Abkühlen stehen gelassen wird. Nach dieser Zeit hat sich der Niederschlag am Boden zusammengeballt, so dass die überstehende Flüssigkeit leicht abgegossen werden kann. Der Niederschlag am Boden des Reagensglases ist selbst bei 0,1% sehr deutlich gelb gefärbt.

Lässt man nun längs der Glaswand des Reagensglases 2 bis 3 Tropfen einer conc. Salpetersäure, die zu etwa  $\frac{1}{3}$  rauchende Salpetersäure enthält, hinunterfliessen, dann beobachtet man sofort oder nach einer Minute am Boden des Gefässes die bekannten Gallenfarbstoff-Reactionen in geradezu prachtvoller Weise, wobei auch die gelbe Farbe des Niederschlages deutlich von den Farbenringen hervortritt.

Diese Probe ist derart empfindlich, dass selbst in Harnen mit 0,2% Galle die Farbenringe — und darunter der charakteristische grüne und blaue Ring — sehr deutlich wahrzunehmen sind. Um in Harnen, die weniger als 0,2% Galle enthalten, den Gallenfarbstoff constatiren zu können, ist es erforderlich, 100 ccm. Harn und 10 ccm. Chloroform in Verwendung zu nehmen und, wie angegeben, die Probe durchzuführen. Man kann auf diese Weise 0,1% mit vollster Sicherheit nachweisen. Somit wäre unsere Probe etwa 20 Mal empfindlicher als die Huppert'sche Probe, die unter den bisherigen Proben als die empfindlichste zu bezeichnen ist. Wir empfehlen somit zum Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harne obige sehr empfindliche Probe in folgender Ausführung:

In einem mit einem Glasstöpsel versehenen Glascylinder (ca. 25 cm. Höhe und 3 cm. Durchmesser) fügt man zu 50 ccm. Harn einige Tropfen verdünnter HCl (10%), Chlorbaryum im Ueberschuss und 5 ccm. reines Chloroform und schüttelt die Lösung mehrere Minuten kräftig durch. Alsdann lässt man den Cylinder etwa 10 Minuten stehen, wobei sich das Chloroform und der Niederschlag zu Boden setzen.

Sollten Theile des Niederschlages noch im Harn suspendirt sein, was namentlich bei zähflüssigen Harnen zuweilen der Fall ist, so genügt es, den Cylinder langsam einigemal hin und her zu bewegen, um den gesammten Niederschlag zu Boden zu bringen.

Nunmehr pipetirt man das Chloroform und den Niederschlag in ein Reagensglas ab. Die geringe Harnmenge, die dabei ebenfalls abpipetirt wird, ist für die Probe ohne Belang.

Das Reagensglas bringt man in ein Wasserbad, welches auf ca. 80° erhitzt ist.

Bei dieser Temperatur ist in 5 bis 10 Minuten das gesammte Chloroform verdampft. Hierauf lässt man das Reagensglas für einige Minuten bei Zimmertemperatur stehen, wobei sich der Niederschlag am Boden des Gefässes zusammenballt, und sich von der überstehenden Flüssigkeit derart trennt, dass letztere leicht abgegossen werden kann.

Der Niederschlag ist, wie schon erwähnt, selbst bei 0,1% Galle noch deutlich gefärbt.

Lässt man nun längs der Glaswandung 3 Tropfen einer conc. Salpetersäure, welcher rauchende Salpetersäure — etwa  $\frac{1}{3}$  — zugesetzt wurde, herunterfließen, dann entstehen sofort oder nach einer Minute am Boden des Gefässes die für Gallenfarbstoff charakteristischen Farbringe, so dass selbst bei 0,2% Galle der charakteristische grüne und blaue Ring noch deutlich zu sehen ist.

Bei Verwendung von 100 ccm. Harn kann noch bei 0,1% Galle mit Sicherheit der Gallenfarbstoffgehalt constatirt werden.

