

Beitrag zur Lehre vom Hämatoporphyrin des Harns.

Von

Prof. E. Nebelthau.

(Aus der medicinischen Klinik zu Marburg.)

Der Redaction zugegangen am 24. April 1899.)

In die medicinische Klinik wurde im Juni 1895 eine Patientin aufgenommen, welche die Zeichen hereditärer Syphilis an sich trug und welche, solange sie sich erinnern konnte, einen burgunderrothen Harn entleerte. Die nähere Untersuchung ergab als die Ursache der Rothfärbung die Ausscheidung eines Farbstoffes, dessen Verhalten an die bekannten Eigenschaften des Hämatoporphyrins erinnerte. Die Patientin, welche Geschwülste im Gesicht und am Kopfe aufwies, wurde längere Zeit in der Klinik behandelt und die Gelegenheit benutzt, um den Farbstoff in grösserer Menge zu genauerer Untersuchung zu gewinnen.

Der Harn zeigte während der ganzen Zeit der Beobachtung abgesehen von physiologischen Schwankungen bezüglich der Menge und des specifischen Gewichtes stets dasselbe Verhalten.

Er wurde vollständig klar entleert, die Farbe war hell burgunderroth, je nach der Menge an Intensität etwas wechselnd. Die Reaction war stark sauer. Der Urin war frei von Eiweiss, Zucker, Aceton und Acetessigsäure: enthielt stets neben dem rothen Farbstoff reichlich Urobilin.

Die Methoden,¹⁾ welche gewöhnlich zum Nachweis des Hämatoporphyrins dienen, führten auch hier zum Ziel, so die

1) Vergl. die ausführliche Zusammenstellung über Hämatoporphyrin in Neubauer und Vogel, Analyse des Harns, III. Auflage, bearbeitet von Huppert-Wiesbaden, 1898.

Methoden von Mac Munn,¹⁾ (Fällung mit Bleizucker und Bleiessig), von Salkowski²⁾ und Hammarsten.³⁾ Der mit Barytmischung erzeugte Niederschlag enthielt den Farbstoff und konnte demselben durch salzsauren Alkohol entzogen werden. Die Lösung gab das Spectrum des salzsauren Hämatoporphyrins. Auch durch Natronlauge konnte nach der Methode von Garrod⁴⁾ ein grosser Theil des Farbstoffes mit den Phosphaten ausgefällt werden. Die Lösung desselben in salzsaurem Alkohol ergab das oben erwähnte Spectrum. Auf Zusatz von Alkali oder Ammoniak zu den salzsauren Lösungen wurde ein 4. oder 5bänderiges Spectrum beobachtet.

Zur Gewinnung des Farbstoffes wurden anfangs grosse Mengen Harns nach der Methode von Salkowski²⁾ mit Baryt ausgefällt, der Niederschlag ausgewaschen und mit salzsaurem Alkohol ausgezogen. Durch Verdünnen des sauren Auszuges mit Wasser fällt ein Theil des Farbstoffes in braunen Flocken aus, während offenbar ein grosser Theil bei diesen Manipulationen zersetzt wird.

Deshalb wurde die Darstellung des Farbstoffes von mir nach anderen Methoden versucht.

Zur Ausfällung desselben aus dem Harn wurde zunächst essigsäures Zink benutzt. Die Ausfällung des Farbstoffes gelingt jedoch auf diese Weise bei saurer Reaction nicht quantitativ, während man durch Neutralisiren des Harns dieselbe vervollständigen kann.

Das stets gleichzeitig im Urin vorhandene Urobilin wird um so mehr in Lösung gehalten, je saurer der Harn reagirt.

Der Zinkniederschlag löst sich in Ammoniak, und man erhält die Absorptionsstreifen des von Hammarsten⁵⁾ beschriebenen Zinkhämatoporphyrins. Die Lösung des Niederschlages

1) Mac Munn, Proc. Royal-Soc.: 1883, Bd. XXXV, S. 394. Brit. Med. Journal 1883, S. 1060.

2) Salkowski, d. Zeitschr., Bd. XV, S. 286, 1891.

3) Hammarsten, Scand. Arch., Bd. III, S. 319, 1892.

4) Garrod, Journ. of Physiol., Bd. XIII, 1892, S. 603, Bd. XVII, 1884-95, S. 349.

5) l. c.

in salzsaurem Alkohol geht nur langsam vor sich und offenbar unter theilweiser Zerstörung des Farbstoffes. Das Spectrum der Lösung entspricht dem des salzsauren Hämatoporphyrins.

Nach dem Auswaschen und Trocknen des mit Zinkacetat erhaltenen Niederschlages wurde derselbe mit Schwefelammonium zerlegt resp. ausgezogen und die Lösung nach dem Verdunsten des Ammoniaks mit Essigsäure gefällt.

Durch wiederholtes Lösen des erhaltenen Niederschlages mit Ammoniak und Fällung mit Essigsäure konnte eine ziemlich grosse Menge eines flockigen und gleichmässig braun aussehenden Niederschlages gewonnen werden, welcher mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet, einen dunkelbraunroth glänzenden, harten Körper darstellte. Derselbe war leicht löslich in Ammoniak und Natronlauge, in Spuren löslich in Eisessig und Mineral-säuren, unlöslich in Wasser, Alkohol und Aether. Nach der Behandlung mit Wasser in geringem Grade in Alkohol löslich, ebenso in essigsäurem Aether.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates betrug 10,22^o (volumetrisch).

0.2160 gr. Substanz hinterliess 0.0106 gr. Asche = 4,9^o.

Die Asche enthielt Phosphorsäure, Calcium, Zink, Eisen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen erwies sich schliesslich zur Ausfällung des Farbstoffes die Essigsäure als ein sehr einfaches und vollkommenes Mittel, zumal bei dieser Art der Ausfällungen das Urobilin vollständig in Lösung gehalten wurde.

Ca. 24—40 Stunden nach Versetzen des Harnes mit einigen cem. Eisessig (5 cem. auf 100 cem. Harn) hat sich der Farbstoff am Boden des Gefässes als ein lockerer Niederschlag oder aber auch in eine Nubecula eingeschlossen, mit einigen Harnsäurecrystallen vollständig abgesetzt. Der Niederschlag mehrerer Tagesportionen wird durch die Centrifuge gesammelt, mit Wasser ausgewaschen und mit Natronlauge behandelt. Es entsteht eine tiefdunkelrothe Lösung des Farbstoffes, welche nach dem Filtriren wiederum mit Essigsäure angesäuert wurde. Dabei fällt der Farbstoff in dicken braunen Flocken

zu Boden, während die darüber stehende Flüssigkeit zunächst einen braunrothen Farbenton zeigt. Der so ausgefällte Farbstoff wird auf dem Filter gesammelt, in Wasser gewaschen und nun in möglichst wenig Natronlauge von Neuem gelöst, um wiederum mit Essigsäure ausgefällt zu werden. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nur noch eine geringe braune Färbung zeigt. Der Niederschlag wird jetzt nach dem Lösen in Natronlauge der Dialyse gegen destillirtes Wasser ausgesetzt, solange bis die Farbstofflösung neutral reagirt. Aus der neutralen Lösung wird der Farbstoff jetzt wiederum durch Essigsäure ausgefällt, auf dem Filter gesammelt und mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen. Dabei erweist sich der Farbstoff nach der Behandlung mit Wasser als nur wenig in Alkohol und Aether löslich.

Der nunmehr im Vacuum über Schwefelsäure getrocknete Farbstoff zeigt eine dunkelrothbraune, glänzende Bruchfläche, und ist in Wasser, Alkohol und Aether unlöslich.

Durch Salzsäure, Schwefelsäure und Eisessig gehen äusserst geringe Mengen des Farbstoffes in Lösung. In Ammoniak und Kalilauge löst sich derselbe leicht.

Von dem so gewonnenen Farbstoff wurden Asche- und Stickstoffbestimmungen ausgeführt, letztere nach Kjeldahl. Die Resultate waren die folgenden:

Präparat II.	0.1356 gr.	Substanz	ergaben	0.01358 gr.	N	=	10,00%
	0.3036 gr.	»	»	0.02954	» N	=	9,7%
	0.0693	»	»	0.0024	» Asche	=	3,4%
Präparat III.	0.0967	»	»	0.00966	» N	=	9,9%
	0.1530	»	»	0.01456	» N	=	9,5%
	0.7804	»	»	0.0240	» Asche	=	3,07%

Die Asche enthielt Phosphorsäure, Calcium und Eisen. Letztere Beobachtung gab Veranlassung zu einer quantitativen Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege nach Umwandlung desselben in Rhodaneisen. Es wurde dazu das von mir, auf Anregung von Prof. Kossel, zur Hämoglobinbestimmung empfohlene Wolffsche Colorimeter benutzt und ein Eisengehalt von 0,37% für den Farbstoff ermittelt.

Der Harn zeigte drei Absorptionsstreifen, welche der Lage nach annähernd den Absorptionsstreifen 2,3,4 des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung entsprachen: von 4 an nach rechts war das Spectrum verdunkelt. Die salzsaure alkoholische Lösung des dargestellten Farbstoffes bot das Spectrum des salzsauren Hämatoporphyrins dar. Die alkalisch gemachte Lösung des salzsauren Farbstoffes liess die bekannten 4 resp. 5 Absorptionsstreifen des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung erkennen. Die Lösung des frisch durch Essigsäure gefällten Farbstoffes in Alkohol oder auch in essigsauerm Alkohol zeigte 2, manchmal auch wohl 4 Absorptionsstreifen. Waren nur 2 Streifen vorhanden, so entsprachen dieselben der Lage nach annähernd den Streifen des metallischen Hämatoporphyrins: waren 4 Streifen nachweisbar, so zeigten dieselben annähernd das Verhalten des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung.

Bei Anwesenheit von Zink in der alkalischen Lösung waren stets nur 2 Absorptionsstreifen vorhanden, welche eine ähnliche Lage aufwiesen, wie sie für das metallische Hämatoporphyrin angegeben wird. (Hammarsten,¹⁾ Garrod.¹⁾

Das genauere spectroscopische Verhalten der Farbstofflösungen wurde mit einem Krüss'schen Apparat, den Herr Prof. Müller die Freundlichkeit hatte, mir zur Verfügung zu stellen, geprüft.

Die Absorptionsstreifen in salzsaurem Alkohol zeigten bei einer Dicke der Flüssigkeitsschicht von 20 mm. dieselbe Wellenlänge, welche von Garrod für die alkoholische Lösung des salzsauren Hämatoporphyrins angegeben worden ist. Die Wellenlänge für den ersten Streifen betrug $\lambda = 597-587$, die für den zweiten $\lambda = 557-541$, während die Wellenlänge des Schattens vor dem letzteren bei der geringen Löslichkeit des Farbstoffes, nicht scharf bestimmt werden konnte.

Zur spectroscopischen Untersuchung des Farbstoffes in alkalischer Lösung wurde eine 0.1^oige ammoniakalische Lösung benutzt. Die Dicke der Flüssigkeitsschicht betrug

¹⁾ l. c.

10 mm. Bei genannter Concentration wurde ein gut begrenzter Absorptionsstreifen zwischen C und D wahrgenommen: sodann begann dicht vor D ein breites Band, welches sich bei weiterer Verdünnung der Lösung aus drei Streifen zusammengesetzt ergab. Der letzte Streifen liess sich auch bei dieser Concentration schon nach violett scharf abgrenzen.

Die Lage der Fraunhofer'schen Linien war bei dem benutzten Apparat die folgende:

C = 14,19, D = 16,05, E = 18,52, b 19,05, F = 20,86.

Das Resultat der Begrenzung der Streifen in Zahlen ausgedrückt war demgemäss:

1. 15,16—15,45.
2. 15,95—20,22.

Nach der Verdünnung der Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser wurde folgende Begrenzung der Absorptionsstreifen festgestellt:

1. 15,18—15,49. $\lambda = 621—610$.
2. 16,02— ?
3. 17,41—18,47. $\lambda = 555—528$.
4. 19,21—20,14. $\lambda = 514—498$.

Nach einem Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung verschwanden die beiden äusseren Streifen, während die beiden mittleren scharf begrenzt und verbreitert hervortraten. Die Begrenzung derselben war folgende:

1. 16,02—16,71. $\lambda = 590—572$.
2. 17,12—18,84. $\lambda = 562—521$.

Nach 48 Stunden zeigte die Lösung im Dunkeln aufbewahrt folgende Begrenzung der Absorptionsstreifen:

1. 16,14—16,84. $\lambda = 587—569$.
2. 17,21—18,81. $\lambda = 560—522$.

Bei weiterer Beobachtung fiel es auf, dass die Lage und Breite der Absorptionsstreifen nicht nur abhängig ist von der Concentration und dem Alter der Lösung, sondern auch von der Menge des zur Lösung angewandten Alkali oder Ammoniak, wie es bereits (Garrod¹⁾) für die Lösung des Hämatoporphyrins angegeben hat.

Zu den folgenden Bestimmungen wurde daher eine 0,1%ige

¹⁾ l. c.

Lösung benutzt, welche 2 Theile Ammoniak in 100 Theilen Wasser enthielt. Die Begrenzung der Absorptionsstreifen war:

1. 15,20—15,46. $\lambda = 620-611$.
2. 16,00— ?
3. ?
4. 18,73—20,37. $\lambda = 523-494$.

Nach Zusatz von dem gleichen Volumen Ammoniaklösung angegebener Concentration wurden die folgenden Verhältnisse festgestellt:

1. 15,20—15,45. $\lambda = 620-611$.
2. 16,12— ?
3. ? —18,76.
4. 19,21—20,21. $\lambda = 514-497$.

Nach Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung war die Lage der zwei entstandenen Streifen die folgende:

1. 16,10—16,80. $\lambda = 588-570$.
2. 17,19—19,03. $\lambda = 560-517$.

48 Stunden später:

1. 16,30—17,08. $\lambda = 583-563$.
2. 17,46—18,89. $\lambda = 554-520$.

Nach 48 Stunden waren die Absorptionsstreifen der ammoniakalischen Lösung weniger scharf von einander zu trennen und wie folgt verschoben:

1. 15,37—15,67.
2. 16,17— ?
3. ? —18,70.
4. ? —20,40.

Nach Verdünnung mit der gleichen Menge Wasser, sodass jetzt eine 0,025%ige Farbstofflösung zur Untersuchung vorlag, änderte sich die Grenze der Absorptionsstreifen wie folgt:

1. um 15,44. $\lambda = 611$.
2. 16,21—16,91. $\lambda = 585-568$.
3. 17,50—18,83. $\lambda = 553-521$.
4. 19,41—20,31. $\lambda = 511-495$.

Nach Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung zu dieser letzten Lösung war die Lage der beiden jetzt entstandenen Streifen:

1. 16,15—16,98. $\lambda = 586—565$.

2. 17,39—18,85. $\lambda = 552—521$.

Ein ähnlicher Wechsel in der Lage der Absorptionsstreifen des dargestellten Farbstoffes abhängig von der Concentration, von dem Gehalt derselben an Alkali und von dem Alter derselben wurde noch in anderen Versuchen, so auch nach Lösung des Farbstoffes in Natronlauge constatirt. Die verschiedenen Angaben Garrod,¹⁾ SAILLET,²⁾ Zoja³⁾ über die Lage der Absorptionsstreifen des Harnhämatorporphyrins erscheinen nach diesen Erfahrungen verständlich.

Die Eigenschaft des Farbstoffes, durch Essigsäure ausgefällt zu werden, konnte zu einer direkten quantitativen Bestimmung desselben mit Hülfe des oben schon erwähnten Colorimeter benutzt werden. An dem Apparat, den ich auf dem 5. Congress für innere Medicin demonstirte, habe ich seitdem, wie ich kurz in der Sitzung des ärztlichen Vereins zu Marburg vom 12. Januar 1898 angegeben,⁴⁾ eine Vereinfachung angebracht, welche sich gut bewährt hat. Bezüglich der Beschreibung des Apparates verweise ich auf die Abhandlung des 15. Congresses für innere Medicin S. 557. Hier sei kurz die erwähnte Vereinfachung hervorgehoben. Dieselbe besteht darin, dass die Vergleichslösungen (Co-hämoglobinlösung oder sonstige Farbstofflösungen) in Kammern eingeschlossen werden, welche nach dem Princip der Zeiss'schen Blutkörperchen-Zählkammer angefertigt sind.

Die Höhe der Kammer, welche von Herrn E. Leitz in Wetzlar geliefert wurde, betrug genau 0,25 mm.

Nach luftdichtem Abschluss derselben mit Wachs und Damarlack kann die einmal hergerichtete Kammer, welche in eine unter dem Schutzkasten angebrachte Schienenvorrichtung eingeschoben wird, zu zahlreichen Versuchen benutzt werden.

Dieselbe tritt an Stelle des Cylinderglases, welches nach der früheren Angabe mit der verdünnten Vergleichslösung beschickt wurde, und die zu untersuchende Farbstofflösung wird

1) l. c.

2) SAILLET, *Revue de médecine*, Bd. 16. 1896.

3) Zoja, *Arch. Ital. di clin. medica*. 1893.

4) Berlin. *Klin. Wochenschrift* Nr. 37. 1898.

jetzt in dem graduirten Cylinder auf die in der Kammer befindliche Farbstofflösung eingestellt.

Aus der Höhe der Vergleichskammer, welche mit der Farbstofflösung von bekanntem Gehalt gefüllt ist, und der Höhe der Flüssigkeitssäule wird der Gehalt dieser Flüssigkeit an Farbstoff in Procent berechnet nach der Formel:

$$x = \frac{0.25 \cdot 1.0}{y}$$

(0.25 Höhe der Vergleichskammer, 1.0 = Procentgehalt der Vergleichslösung an Farbstoff, y = Höhe der Flüssigkeitssäule in dem graduirten Cylinder.)

Bei meinen Bestimmungen kam eine Farbstofflösung als Vergleichslösung zur Anwendung, welche in 10 ccm. genau 0,1 gr. Farbstoff gelöst enthielt. Als Lösungsmittel diente möglichst wenig Natronlauge. Von der Tagesmenge wurden je 100 mit 5 ccm. Eisessig im Spitzglase versetzt.

Nach 48 Stunden wird vom Sediment die überstehende Flüssigkeit möglichst abgossen, das Sediment mit Hülle der Centrifuge gesammelt, mit Wasser gründlich gewaschen, in Natronlauge gelöst und genau mit Wasser auf 50 ccm. aufgefüllt. Der ausgeschiedene Harn und Farbstoff belief sich an 11 Tagen auf folgende Mengen:

1. 1100 ccm. Harn enthielten	0,06215 gr. Farbstoff
2. 1250	0,05187
3. 1220	0,04209
4. 1200	0,04851
5. 1200	0,04284
6. 1200	0,04410
7. 1200	0,04416
8. 1200	0,04542
9. 970	0,02796
10. 1220	0,03812
11. 3600	0,0258

im Mittel 1130 ccm. Harn enthielten 0,04089 gr. Farbstoff.

Es sei bemerkt, dass die quantitative Bestimmung des Farbstoffes auf dem angeführten Wege offenbar genaue Resultate ergab, da eine abgewogene Menge des Farbstoffes, welche dem Harn zugesetzt wurde, mit Essigsäure ausgefällt und colorimetrisch bestimmt, keine Verluste erkennen liess.

Es handelt sich also in unserem Falle um einen Farbstoff, welcher durch sein Verhalten gegen Alkalien und Essigsäure gut charakterisirt ist. Gefällt wird derselbe aus dem Harn und seinen alkalischen wässerigen Lösungen durch Essigsäure; aus seinen alkalischen Lösungen auch durch Salzsäure und Schwefelsäure.

Durch Behandlung mit diesen Mineralsäuren und Alkohol wird Lösung eines geringen Theiles des Farbstoffes erzielt: die Lösung zeigt spectroscopisch das Verhalten des mineral-sauren Hämatoporphyrins.

Der Farbstoff löst sich in Alkali und Ammoniak und bietet in diesen Lösungen ein vier- oder fünfbänderiges, nicht gleichmässig abgrenzbares Spectrum dar.

Spectroscopisch würde sich der Farbstoff demgemäss ähnlich wie der als Hämatoporphyrin beschriebene Farbstoff des Urins verhalten.

Die Ausfällung des Hämatoporphyrins aus alkalischer Lösung mit Essigsäure vollzogen bereits Nencki und Sieber¹⁾ und Stokvis²⁾, während die Fällung des Hämatoporphyrin aus Harn mit Essigsäure bisher nicht gebräuchlich gewesen zu sein scheint.

Da sich die Essigsäure zur Ausfällung meines Farbstoffes aus dem Harn als sehr geeignetes Fällungsmittel erwies, so wäre in diesem Verhalten, ebenso wie in dem gegen Alkalien, eine weitere Uebereinstimmung mit dem Hämatoporphyrin von Nencki und Sieber vorhanden. Letzteres enthielt nach der von diesen Autoren aufgestellten Formel ($C_{16}H_{18}N_2O_3$) 9,7% N, mein Präparat im Durchschnitt 9,8% N.

Demgegenüber ist der geringe Eisengehalt der Asche wohl kaum bemerkenswerth: es ist die Möglichkeit vorhanden, dass das Eisen in meinem Falle einem Theil des Farbstoffes mehr oder minder fest anhaftete. Die Ausfällung des Farbstoffes mit Essigsäure aus dem Harn wird auch in Zukunft zu em-

1) Nencki und Sieber, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm., Bd. XXIV, S. 430.

2) Stokvis, Nederland Tijdschrift voor Geneeskunde, 1889, II, p. 413.

pfehlen sein, wenn es sich um Harn handelt, welche der Anwesenheit von Hämatoporphyrin oder diesem nahestehender Farbstoffe verdächtig sind, da die Art der Behandlung wenig eingreifend ist. Ausser in dem beschriebenen Falle gelang es mir noch in drei weiteren Fällen, in denen infolge der Rothfärbung und des spectroscopischen Verhaltens Hämatoporphyrin im Harn vermuthet wurde, den Farbstoff mit Essigsäure zu fällen.

Es handelte sich um den Harn eines Falles von Sulfonalvergiftung, eines Typhuskranken und eines an schwerer Anämie erkrankten Patienten.

Ueber den Eisengehalt der Asche meines Farbstoffes war ich damals noch nicht orientirt, sodass in diesen drei Fällen in der Annahme, es handele sich um gewöhnliches Hämatoporphyrin, die Prüfung auf Eisen unterblieb.

Hierauf wird in Zukunft zu achten sein.

Für die Ausscheidung der grossen Mengen des Farbstoffes konnte in meinem Falle, ebensowenig wie für die Ausscheidung des Hämatoporphyrins in den Fällen von Sobernheim,¹ Neusser²) etc., kein Grund ermittelt werden.

Die hereditäre Syphilis konnte nicht ohne weiteres dafür verantwortlich gemacht werden, zumal sich keinerlei Veränderungen im Bereich des Tractus intestinalis und tropoeticus feststellen liessen.

Die Untersuchung des Blutes ergab eine gute Beschaffenheit desselben. Im Blutserum und in den Faeces konnte nie ein entsprechender Farbstoff nachgewiesen werden.

¹ Sobernheim, Deutsche med. Wochenschrift Nr. 24. 1892.

² Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch., 84. 3 Abth. 1881.