

Zur Kenntnis der Guajakblutprobe und einiger ähnlicher Reaktionen.

Von
O. Schumm.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses
Hamburg-Eppendorf.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. Dezember 1906.)

Die Guajakblutprobe wird zum Nachweis von Blut besonders in klinischen Fällen außerordentlich häufig angewandt. Sie bewährt sich in der Tat vortrefflich, wenn sie in der richtigen Weise gehandhabt wird. Dazu ist allerdings eine genauere Kenntnis von den Eigentümlichkeiten dieser Reaktion erforderlich.

Zu ihrer Ausführung verwendet man bekanntlich einen alkoholischen Auszug aus Guajakharz und «ozonisiertes» Terpentinöl. Ganz verbreitet ist die Annahme, daß man statt des ozonisierten Terpentinöls mit gleichem Erfolge Wasserstoffsperoxyd benutzen könne. In Wirklichkeit ist aber die Guajakprobe, wenn sie mit Wasserstoffsperoxyd ausgeführt wird, etwas weniger empfindlich als bei der Verwendung von Terpentinöl. Die Angabe Carlsons,¹⁾ daß das Wasserstoffsperoxyd (3%) dieselbe Wirkung ausübe wie das Terpentinöl, aber eine sicherere und kräftigere und demzufolge schärfere Reaktion gäbe, erklärt sich wahrscheinlich dadurch, daß das von Carlson zu seinen vergleichenden Versuchen benutzte Terpentinöl nicht besonders wirksam war.

Die tatsächliche Überlegenheit des Terpentinöls macht sich nicht nur bei der Untersuchung wässriger Blutlösungen geltend,

¹⁾ C. E. Carlson, Die Guajakblutprobe und die Ursachen der Blaufärbung der Guajaktinktur, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, H. 1, S. 69 u. f., 1906.

sondern auch bei sauren ätherischen Hämatinlösungen. Als Beweis für seine Auffassung, «daß die Empfindlichkeit der Probe erheblich gesteigert wird»,¹⁾ wenn man nämlich statt des Terpentins Wasserstoffsuperoxyd anwendet, führt Carlson folgenden Versuch an: «Ein halber Kubikzentimeter frischen Ochsenblutes wurde in 1000 ccm Aqua destillata aufgelöst. 1 ccm hiervon ergab mit Guajaktinktur und Wasserstoffsuperoxyd eine deutliche Färbung. Bei Anwendung von Terpentinöl, und zwar von altem, welches einen Monat hindurch der Luft und dem Tageslicht ausgesetzt gewesen war, blieb die Reaktion bei ganz derselben Quantität Blutlösung aus.»

Danach würden sich 0,5 mg Ochsenblut in 1 ccm Wasser durch die Guajakterpentinölprobe nicht mehr nachweisen lassen. Ich habe den Versuch zunächst mehrfach in der von Carlson angegebenen Weise wiederholt. Dabei entstand in der Kuppe des Reagenzglases eine deutliche Blaufärbung. Dann habe ich ebenfalls an 1 ccm der Blutlösung die Probe mit Guajaktinktur und Terpentinöl ausgeführt. Dabei entstand schon innerhalb $\frac{1}{4}$ Minute eine bläuliche Färbung; überschichtete ich dann die Flüssigkeit mit etwas Alkohol, so ging der gebildete Farbstoff in diesen über. Die erzielte Blaufärbung war stärker als bei der Probe mit Wasserstoffsuperoxyd. Daß die Guajakterpentinölprobe noch bei einer Blutverdünnung von 1 : 25000 bis 1 : 80000 positiv ausfällt, wenn man 8 ccm der Blutlösung verwendet, habe ich schon früher nachgewiesen.²⁾

Mit Rücksicht auf die meinen Erfahrungen widersprechenden Angaben Carlsons habe ich jedoch nochmals die Empfindlichkeit der Guajakprobe an frisch hergestellten Lösungen durch Venaesektion entnommenen und defibrinierten menschlichen Blutes nachgeprüft und zwar in folgender Weise:

¹⁾ l. c. S. 72.

²⁾ O. Schumm und C. Westphal, Über den Nachweis von Blutfarbstoff mit Hilfe der Adlerschen Benzidinprobe, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 511, 1905.

O. Schumm und H. Remstedt, Über den Nachweis von Blut mit Hilfe der Paraphenylendiaminreaktion, Zentralblatt f. Innere Medizin, 1906, Nr. 40.

Guajakterpentinölprobe:

a) 1 ccm Blutlösung, 2—3 Tropfen frisch hergestellte, filtrierte 10%ige Guajaktinktur, 20 Tropfen Terpentinöl (spez. Gew. 0,95). Mehrfach geschüttelt, nach 2 Minuten einige Kubikzentimeter Alkohol zugesetzt.

b) Blindversuch: Statt der Blutlösung 1 ccm Wasser, sonst wie a.

Guajakwasserstoffsperoxydprobe:

a) 3 ccm 10%ige Guajaktinktur mit 2 ccm Wasserstoffsperoxyd (3%) gemischt. Mittels Pipette 1 ccm Blutlösung zugesetzt (nach Carlson).

b) Blindversuch: Statt der Blutlösung 1 ccm Wasser, sonst wie a.

I. Lösung von 0,5 g Blut in 1000 g Wasser.

1. Guajakterpentinölprobe: Innerhalb 2 Minuten hellblau, bei Alkoholzusatz starke Blaufärbung. Blindversuch: negativ, keine Farbenänderung.

2. Guajakwasserstoffsperoxydprobe: Nach etwa 10 Sekunden ist die in der Kuppe des Reagenzglases befindliche untere Partie der milchig-trüben Flüssigkeitsschicht blau gefärbt. Beim Umschütteln verschwindet die Blaufärbung sofort.

II. Lösung von 0,25 g Blut in 1000 g Wasser.

1. Guajakterpentinölprobe: Innerhalb 2 Minuten grünlich-blau, bei Zusatz von Alkohol Blaufärbung. Blindversuch: negativ, keine Farbenänderung.

2. Guajakwasserstoffsperoxydprobe: Innerhalb 2 Minuten gut erkennbare Blaufärbung in der Kuppe des Reagenzglases.

III. Lösung von 0,1 g Blut in 1000 g Wasser.

1. Guajakterpentinölprobe: Innerhalb 2 Minuten schwache Blaufärbung, nach Zusatz von Alkohol stärkere Blaufärbung.

Blindversuch: negativ, keine Farbenänderung.

2. Guajakwasserstoffsperoxydprobe: Innerhalb 2 Minuten schwache Blaufärbung in der Kuppe des Reagenzglases, deutlich Differenz gegenüber dem Blindversuch.

IV. Lösung von 0,06 g Blut in 1000 g Wasser.

1. Guajakterpentinölprobe: Innerhalb 2 Minuten schwache bläuliche Färbung, nach Alkoholzusatz noch deutlicher blau.

Blindversuch: negativ, keine Farbenänderung.

2. Guajakwasserstoffsperoxydprobe: Innerhalb 2 Minuten minimale bläulich-grüne Färbung in der Kuppe des Reagenzglases, geringe Differenz gegenüber dem Blindversuch.

V. Lösung von 0,03 g Blut in 1000 g Wasser.

1. Guajakterpentinölprobe: Innerhalb 2 Minuten schwache, aber deutliche Bläuung, nach Alkoholzusatz noch deutlicher hellblau.

Blindversuch: negativ, keine Farbenänderung.

2. Guajakwasserstoffsperoxydprobe: negativ.

Es ergab also bei der Probe mit Guajaktinktur und Terpentinöl 1 ccm mit einem Gehalt von 0,03 mg Blut eine noch deutlich erkennbar positive Reaktion; bei der Probe mit Guajaktinktur und Wasserstoffsperoxyd 1 ccm mit einem Gehalt von 0,06 mg Blut eine nur eben erkennbar positive Reaktion, und zwar auch nur bei sehr vorsichtiger Unterschichtung. Entgegen der Angabe Carlsons wird also die Empfindlichkeit der Guajakprobe durch Verwendung von Wasserstoffsperoxyd nicht nur nicht gesteigert, sondern vielmehr etwas herabgesetzt.

Um die angegebene Empfindlichkeit zu erreichen, muß man allerdings ein gut wirksames Öl verwenden.

Wenn nun Carlson bemerkt: «Indessen sind keine Proben bekannt (außer gerade die mit Guajaktinktur und Blut), die zeigen, wie stark ozonhaltig das Terpentinöl sein soll, damit es überhaupt für die Probe in Frage kommen kann», so möchte ich daraufhin angeben, wie ein geeignetes Öl zu beschaffen ist und einige Eigenschaften eines solchen beschreiben.

Das im Handel befindliche Terpentinöl ist im allgemeinen nicht wirksam genug. Ebenso erhielt ich kein brauchbares Öl, wenn ich das käufliche Terpentinöl in den gewöhnlichen enghalsigen oder selbst in weithalsigen Flaschen offen, dem Lichte ausgesetzt, mehrere Wochen stehen ließ.

Dagegen gelang es mir, ein vorzüglich wirksames Öl in verhältnismäßig kurzer Zeit zu beschaffen, wenn ich das käufliche Öl in weiten flachen Porzellanschalen (am besten in sogenannten Krystallisierschalen) in dünner Schicht bei Zimmertemperatur im zerstreuten Tageslicht aufbewahrte. Läßt man das Öl in einer solchen Schale lange Zeit stehen, so wird es dickflüssig wie Sirup und riecht endlich kaum mehr wie frisches Terpentinöl. Während das frische käufliche Terpentinöl ein spezifisches Gewicht von etwa 0,87 hat, war es bei einem solchen dickflüssigen Öl = 1,23. Ein so dickflüssiges Öl ist als Reagens nicht geeignet, trotzdem es eine sehr kräftige Wirkung besitzt. Durch Verdünnen mit etwa der fünffachen Menge gewöhnlichen Terpentinöls läßt sich daraus aber ein als Reagens geeignetes Öl herstellen. Gewöhnlich verwende ich als Reagens ein Öl, das durch Aufbewahren in der oben be-

schriebenen Weise ein spezifisches Gewicht von etwa 0,95 angenommen hat. Da die im Handel befindlichen Terpentinöle nicht die gleiche chemische Zusammensetzung haben, vermag ich nicht anzugeben, ob die Feststellung des angegebenen spezifischen Gewichts (etwa 0,95) in jedem Falle als ein Maßstab für die Brauchbarkeit des Öls als Reagens gelten kann, und habe daher versucht, die Wirksamkeit des Terpentinöls, die ich im folgenden kurz als «Oxydationskraft» bezeichnen will, in folgender Weise festzustellen: Ich ließ das Öl in einer mit Glasstöpsel verschlossenen Flasche unter Umschütteln 3 Minuten lang auf eine jedesmal frisch hergestellte Lösung von reinstem Jodkalium einwirken. Dann wurde das Gemisch sofort mit einer größeren Portion Äther ausgeschüttelt, die das Jod enthaltende ätherische Lösung zweimal mit je 4 ccm Wasser ausgeschüttelt, in eine Glasstöpselflasche übergeführt und nach Zusatz von 10 ccm Wasser unter heftigem Schütteln mit $\frac{1}{10}$ N.-Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung titriert. Die Untersuchung einer Anzahl von Proben ozonisierten Terpentinöls ergab dabei sehr stark abweichende Werte, wie folgende Beispiele zeigen:

1. Terpentinöl vom spez. Gewicht 0,88 (aus einer Apotheke als ozonisiertes Terpentinöl bezogen).
 - a) 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Öl. 3 Minuten geschüttelt. Mit 50 ccm Äther extrahiert usw. Zur Entfärbung erforderlich **0,3** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfatlösung.
 - b) Versuch wiederholt. Erforderlich 0,3 ccm.
2. Terpentinöl vom spez. Gewicht 0,90 (selbst hergestellt).
 - a) 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Öl. 3 Min. geschüttelt usw. wie bei 1. Zur Entfärbung erforderlich **0,7** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat.
 - b) Versuch wiederholt. Erforderlich 0,7 ccm.
3. Terpentinöl vom spez. Gewicht 0,95 (selbst hergestellt).
 - a) 2 g KJ, 2 g Wasser, 2,05 g Öl. 3 Min. geschüttelt usw. wie bei 1. Zur Entfärbung erforderlich **2,0** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat.
 - b) Versuch wiederholt mit 2,10 g Öl. Erforderlich **2,1** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat.
4. Terpentinöl vom spez. Gewicht 1,23 (selbst hergestellt).
 - a) 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Öl. 3 Min. geschüttelt. Mit 50 ccm Äther extrahiert usw. Erforderlich **4,15** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat.
 - b) Versuch wiederholt mit 2,05 g Öl. 3 Min. geschüttelt. Mit 80 ccm Äther extrahiert usw. Erforderlich **4,0** ccm $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat.

c) Versuch wiederholt mit 2 g Öl. 3 Min. geschüttelt. Mit 60 ccm Äther extrahiert usw. Erforderlich 4,0 ccm n_{10} -Natriumthiosulfat.

Auch das Verhalten der Guajakterpentinölprobe gegenüber metallischem Quecksilber bietet einen Anhalt dafür, ob ein Terpentinöl als Reagens auf Blutfarbstoff brauchbar ist. Schüttelt man nämlich einige Kubikzentimeter eines als Reagens auf Blutfarbstoff gut wirkenden Terpentinöls in einem trocknen, verschlossenen, nicht zu kleinen Glase mit etwas Quecksilber tüchtig durch, sodaß letzteres sehr fein verteilt ist, fügt dann 10 Tropfen frischer Guajaktinktur (aus 1 Teil Harz und 9 Teilen 90⁰/₀igem Alkohol) hinzu und schüttelt kräftig, so entsteht sehr schnell eine starke Blaufärbung.

Endlich habe ich versucht, die Oxydationskraft des ozonisierten Terpentinöls direkt mit der des Wasserstoffsuperoxyds zu vergleichen, indem ich letzteres auf eine konzentrierte Jodkaliumlösung einwirken ließ und das frei gemachte Jod in der vorhin beim Terpentinöl beschriebenen Weise bestimmte. Bei zwei Präparaten von käuflichem 3⁰/₀igem (= 10 Vol. ⁰/₀) Wasserstoffsuperoxyd (Merck) erhielt ich konstante Werte:

Präparat A.

1. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsuperoxyd, nach 1 Min. mit 70 ccm Äther extrahiert, Ätherlösung zweimal mit 4 ccm Wasser gewaschen usw. Erforderlich **0,65** ccm n_{10} -Natriumthiosulfat.
2. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach $\frac{1}{2}$ Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,65** ccm.
3. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach $\frac{1}{4}$ Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,65** ccm.
4. 2 g KJ, 2 g Wasser, 4 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach 1 Min. extrahiert usw. Erforderlich **1,20** ccm.

Präparat B.

1. 2 g KJ, 4 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach 3 Min. extrahiert. Erforderlich **1,1** ccm n_{10} -Natriumthiosulfat.
2. 2 g KJ, 4 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach $\frac{1}{2}$ Min. extrahiert usw. Erforderlich **1,15** ccm.
3. 2 g KJ, 4 g Wasserstoffsuperoxyd. Nach 1 Min. extrahiert usw. Erforderlich **1,15** ccm.

Dagegen gab ein aus frisch in Originalpackung bezogenem 30⁰/₀igem (= 100 Vol. ⁰/₀) Wasserstoffsuperoxyd (Merck) durch

Verdünnen hergestelltes 3^o/_oiges (= 10 Vol. ^o/_o) Präparat ganz abweichende Zahlen:

1. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsperoxyd. Nach 1 Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,2** ccm ⁿ/₁₀-Natriumthiosulfat.
2. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsperoxyd. Nach ¹/₄ Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,25** ccm.
3. 2 g KJ, 2 g Wasser, 2 g Wasserstoffsperoxyd. Nach ¹/₂ Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,25** ccm.
4. 2 g KJ, 2 g Wasser, **6** g Wasserstoffsperoxyd. Nach ¹/₂ Min. extrahiert usw. Erforderlich **0,3** ccm.

Daß die Reaktion bei diesem Präparat gänzlich anders verlief, zeigte sich schon äußerlich, indem die zunächst eintretende durch Jodausscheidung bedingte Braunfärbung sich schnell beträchtlich aufhellte. Bei Zusatz des unverdünnten 30^o/_oigen (= 100 Vol. ^o/_o) Wasserstoffsperoxyds zu Jodkaliumlösung kam es überhaupt nicht zur Ausscheidung von freiem Jod.

Vielleicht steht mit dem abweichenden Verhalten der verschiedenen Präparate von Wasserstoffsperoxyd gegenüber Jodkalium eine Beobachtung in Zusammenhang, die ich einigemal machte, daß nämlich die Blaufärbung einer positiven Guajakwasserstoffsperoxydblutprobe auffallend schnell wieder verblaßte.

Ein direkter Vergleich der Oxydationskraft eines Terpentinöls mit der des Wasserstoffsperoxyds ist in der angegebenen Weise nicht möglich.

Nach meinen bisherigen Erfahrungen glaube ich nun annehmen zu dürfen, daß ein Terpentinöl als Reagens auf Blutfarbstoff gut brauchbar ist, wenn es folgenden Anforderungen genügt: Es soll ein spezifisches Gewicht von etwa 0,95 haben und bei dem oben angegebenen Versuch mit Quecksilber und Guajaktinktur schnell eine starke Blaufärbung geben. 2 g des Öls sollen unter den oben beschriebenen Bedingungen eine etwa 2 ccm ⁿ/₁₀-Natriumthiosulfatlösung äquivalente Menge Jod liefern. Endlich soll das Öl die Guajaktinktur nicht direkt bläuen.

Daß das Terpentinöl an sich die Eigenschaft hatte, Guajaktinktur zu bläuen, habe ich in den letzten Jahren nur zweimal beobachten können. In beiden Fällen hatte das betreffende Vorratsgefäß an heißen Sommertagen im direkten Sonnenlichte gestanden. Die Eigenschaft verlor sich, nachdem das Gefäß

einige Tage an einem dunklen Orte aufbewahrt worden war. Diese Eigentümlichkeit des Terpentinöls muß beachtet werden.

Die für die Guajakblutprobe erforderliche Tinktur ist frisch herzustellen, indem man eine Messerspitze voll des Harzpulvers (etwa 0,5 g) in einem Reagenzglase mit 3—5 ccm 90^o/_oigen Alkohols etwa 1 Minute schüttelt und nach kurzem Stehenlassen etwa 10 Tropfen möglichst klar abgießt oder noch besser abfiltriert. Das Harzpulver selbst braucht nicht frisch zu sein. Ist es aus einem nicht zu alten, unzersetzten Harz hergestellt worden, und wird es in einer verschlossenen Blechbüchse oder in einem braunen Glase, vor Licht geschützt, aufbewahrt, so hält es sich recht lange. Die angegebene Menge Tinktur, 10 Tropfen, bewährt sich durchschnittlich am besten. Handelt es sich um den Nachweis kleinster Blutmengen, so nimmt man zweckmäßig noch weniger, drei bis fünf Tropfen, da gerade bei sehr kleinen Blutmengen ein Überschuß von Guajaktinktur die Reaktion stört. Dies gilt sowohl, wenn man die Reaktion in alkoholischer oder ätherischer als auch, wenn man sie in wässriger Lösung ausführt. Zum Beispiel wird bei der Anwendung auf Harn die höchste Empfindlichkeit dann erreicht, wenn man zu etwa 5 ccm nur etwa 5 Tropfen Guajaktinktur und etwa 20 Tropfen Terpentinöl zusetzt und unter öfterem Schütteln einige Minuten stehen läßt. Der entstehende Farbstoff löst sich dabei in dem Terpentinöl, das sich als grün oder blau gefärbte Schicht über der wässrigen Flüssigkeit abscheidet. Gießt man einige Kubikzentimeter Alkohol auf die Terpentinölschicht, so wird die Färbung noch deutlicher. Man erzielt so noch eine deutliche Blaufärbung bei Urinen, die bei der Prüfung mit Guajaktinktur und Wasserstoffsperoxyd auch in der von Carlson vorgeschlagenen Ausführungsform teils negativen Ausfall, teils nur eine kaum erkennbare bläuliche Färbung gaben.

Daß ebenfalls beim Nachweis von Blut in den Faeces das Terpentinöl dem Wasserstoffsperoxyd vorzuziehen ist, habe ich schon an anderer Stelle¹⁾ hervorgehoben und seitdem in wiederholten Vergleichsversuchen bestätigt gefunden. In Fällen,

¹⁾ O. Schumm, Die Untersuchung der Faeces auf Blut. Jena 1906. Verlag von Gustav Fischer.

bei denen die mit Wasser gewaschenen Essigsäureätherextrakte mit Guajaktinktur und Terpentinöl innerhalb 2 Minuten noch einen starken Farbenschlag von gelb nach blaugrün oder violett geben, erhält man mit Wasserstoffsuperoxyd oft eine nur wenig ausgeprägte Grünfärbung der oberen und eine sehr schwache Rosafärbung der unteren Flüssigkeitsschicht.

Bekanntlich wird die Guajakblutprobe durch Alkalien und Mineralsäuren gestört. In ammoniakalischer Gärung befindliche Harne sind deshalb vor Anstellung der Probe mit Essigsäure anzusäuern. Bei Magensaft beseitigt man den störenden Einfluß der freien Salzsäure, indem man ihn zunächst mit $n/10$ -Kalilauge oder konzentrierter Sodalösung neutralisiert oder schwach alkalisiert und dann mit Essigsäure ansäuert.

Der praktische Wert einer Blutprobe hängt ab von ihrer Zuverlässigkeit, leichten Ausführbarkeit und Empfindlichkeit. Hinsichtlich der beiden letzteren Anforderungen genügt die Guajakterpentinprobe in den meisten Fällen. Dagegen gilt sie vielfach als unzuverlässig und sehr wenig eindeutig. Wenn demgegenüber die Zuverlässigkeit anderer Proben, besonders der Teichmannschen und der spektroskopischen Probe betont wird, so muß darauf hingewiesen werden, daß bei klinischen Untersuchungen die Teichmannsche Probe auch bei sorgfältiger Ausführung nicht selten versagt, trotzdem Blutfarbstoff in solcher Menge vorhanden ist, daß danach ein positiver Ausfall der Probe zu erwarten wäre. Die spektroskopische Untersuchung, besonders in der Form der Hämochromogenprobe ist von größter Bedeutung. Ihre Empfindlichkeit ist aber meist geringer als die der Guajakprobe und ähnlicher Reaktionen und reicht leider in sehr vielen Fällen nicht aus. Die bei Harn vielfach angewandte, im allgemeinen recht bewährte Hellersche Probe (Kochen mit Lauge) ist nicht frei von Fehlerquellen. So erhielt ich positive Proben bei von Blutfarbstoff sicher freien hämatoporphyrinreichen Urinen, ebenso bei Harn, der nach Genuß pflanzlicher Medikamente (Rheum usw.) entleert worden war. Bei klinischen Untersuchungen ist man vielfach geradezu auf die Guajakprobe oder eine analoge Reaktion angewiesen und muß deshalb mit ihren Fehlerquellen vertraut sein.

Ein positiver Ausfall der Probe kann nun allerdings durch eine ganze Reihe von Stoffen bewirkt werden. Davon kommen aber bei klinischen Untersuchungen nur wenige in Betracht. Besonders sind es oxydierende Fermente, die zu Fehlern führen können. Diese in den Geweben und Säften des tierischen und pflanzlichen Organismus weit verbreiteten Stoffe kann man dadurch unschädlich machen, daß man die zu untersuchende Flüssigkeit vor Anstellung der Probe aufkocht (z. B. bei eiterhaltigem Urin, Speichel, Schleim, Magensaft). Von anorganischen Stoffen, die ebenfalls die Reaktion geben, kommen in Betracht Jodkalium, Ferrisalze, salpetrige Säure. Wie schon Schaer¹⁾ betont hat, verläuft die Reaktion hierbei aber insofern anders, als diese Stoffe die Guajaktinktur direkt bläuen, ohne daß Terpentinöl zugesetzt wird. Auch das käufliche Ferrosulfat, das meist etwas Oxydsalz enthält, bewirkt an sich schon eine mehr oder weniger ausgeprägte Bläuung der Guajaktinktur. Immerhin kämen die Ferroverbindungen und Jodkalium wohl noch am ehesten als Fehlerquellen in Betracht. Um sich auch dagegen vollständig zu schützen, muß man im Zweifelsfalle das Untersuchungsmaterial nach dem Vorgange Webers²⁾ mit Essigsäure und Äther extrahieren, die saure Ätherlösung dann noch zweimal mit kleinen Portionen Wasser ausschütteln und mit der klar abgetrennten eventuell noch filtrierten Ätherlösung die Reaktion ausführen.

In welcher Weise die Guajakprobe auf Faeces anzuwenden ist, um auch einen sehr geringen Blutgehalt sicher zu erkennen, habe ich an anderer Stelle ausführlich beschrieben.³⁾

Die Brauchbarkeit der Guajakprobe für manche klinische Zwecke ist bezweifelt worden, weil angeblich auch die Galle einen positiven Ausfall verursachen kann. Leider stand mir nur ein Fall von Gallenfistel beim Menschen zur Verfügung.

Durch die Freundlichkeit des Herrn Dr. Kotzenberg

¹⁾ Ed. Schaer, Neuere Beobachtungen über Blutnachweis mittels der Guajakprobe, Archiv der Pharmacie, 1898, S. 571.

²⁾ H. Weber, Über den Nachweis des Blutes in dem Magen- und dem Darminhalt, Berl. klinische Wochenschrift, 1893, Nr. 19, S. 441.

³⁾ l. c.

(Sekundärarzt der chirurg. Abteilung) erhielt ich ein Quantum der aus der Fistel ausgeflossenen Galle. Bei direktem Zusatz von Guajaktinktur und Terpentinöl fiel dabei die Probe negativ aus. Ich habe weiter in Ermangelung geeigneten Materials die aus Gallenblasen von Leichen entnommene Galle untersucht. Dabei erhielt ich häufig positive Guajakproben. Wiederholt zeigte sich, daß die Galle nach dem Aufkochen eine etwas schwächere Reaktion gab. Diese Beobachtung konnte ich bestätigen, indem ich solche Galle roh und gekocht der hochempfindlichen Adlerschen Benzidinprobe¹⁾ unterwarf.

Auch bei der Blasengalle von Rindern erhielt ich wiederholt bei der rohen Galle eine intensivere Reaktion als bei der gekochten. Es ist daher wahrscheinlich, daß an einem positiven Ausfall der genannten Reaktion bei roher Blasengalle oft ein Oxydationsferment mit beteiligt ist. In der Hauptsache werden aber die ausgesprochen positiven Reaktionen durch eine hitzebeständige Substanz bedingt. Ich vermutete, daß es sich entweder um eine Eisenverbindung oder um Blutfarbstoff, möglicherweise um eine Zwischenstufe zwischen Hämatin und Gallenfarbstoff handelte, und untersuchte daher zunächst eine Anzahl Gallenblasen von Rindern in folgender Weise. Sofort nach dem Schlachten wurden die Blasen abgebunden und nach Verlauf einer Stunde nach sorgfältiger Reinigung entweder durch einen kleinen Schnitt geöffnet oder an einer Stelle angebrannt und dann angestochen. Die austretende Flüssigkeit wurde in zwei Portionen getrennt aufgefangen. Die zuerst ausfließende Portion wurde nicht benutzt. Eine Blutbeimengung von außen wurde sicher vermieden. Von der anderen Portion wurde ein Teil, wenn nötig nach dem Verdünnen mit Wasser, spektroskopisch untersucht. Die fast ausnahmslos mehr oder weniger stark olivgrün gefärbte Galle zeigte in allen Fällen ein charakteristisches vierstreifiges Spektrum (der erste Streifen deckte den dunkelsten Teil des Rot und reichte bis $\mu\mu$ 630. Lage der übrigen Streifen 605—585, 570—557, 530—517). Ein Blutfarbstoffspektrum wurde in keinem Falle beobachtet.

¹⁾ O. und R. Adler, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, Heft 1.

Etwa 10—20 ccm der Galle wurden mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol vermischt, gleichviel Äther hinzugefügt und die Mischung nach kurzem Stehen filtriert. Das Filtrat zeigte meist noch deutlicher das oben beschriebene Spektrum. Der Filtrerrückstand wurde mit Äther gewaschen, mit Eisessig ausgezogen, der Auszug mit dem doppelten bis dreifachen Volumen Äther vermischt, $\frac{1}{2}$ Volumen Wasser zugesetzt und tüchtig durchgeschüttelt. Die abgetrennte Ätherlösung wurde nochmals mit einigen Kubikzentimetern Wasser ausgeschüttelt. Kleinere Portionen der Ätherlösung wurden mit der Guajakterpentinölprobe und einigemal auch mit der Benzidinprobe geprüft. Die Hauptmenge wurde mit Ammoniak in geringem Überschuß geschüttelt, die ammoniakalische Lösung abgetrennt und etwas Hydrazinhydrat zugesetzt, um etwa vorhandenes Hämatin in Hämochromogen zu überführen. Das Ergebnis war folgendes:

	Guajakterpentinöl- probe	Benzidinprobe	Spektroskopische (Hämochromogen-) Probe
Galle 1	negativ	—	negativ
» 2	schwach positiv	—	»
» 3	negativ	—	»
» 4	schwach positiv	—	»
» 5	» »	—	»
» 6	negativ	—	»
» 7	schwach positiv	—	»
» 8	» »	positiv	»
» 9	» »	»	»
» 10	» »	ziemlich stark positiv	»
» 11	» »	» » »	»

Wie ich schon früher festgestellt habe, kann man bei dieser Anwendungsform der Guajakprobe einen positiven Ausfall weder auf Oxydationsfermente noch auf anorganische Eisenverbindungen zurückführen. Da andere bekannte Stoffe hier nicht in Betracht kommen, ist der positive Ausfall der ange-

gebenen Reaktionen nur durch die Anwesenheit von Spuren eines Blutfarbstoffs in der Galle zu erklären.

In mehreren Versuchen wurde die Leber mit der daran befindlichen Gallenblase einige Stunden liegen gelassen, ohne daß der Ductus cysticus abgebunden worden war. Dabei wurden folgende Befunde erhoben:

	Guajakterpentinölprobe	Benzidinprobe	Spektroskopische (Hämochromogen-) Probe
a) 2 Stunden nach dem Tode untersucht:			
Galle 12	negativ	positiv	negativ
» 13	»	—	»
» 14	»	positiv	»
» 15	mäßig stark positiv	—	»
» 16	negativ	—	»
» 17	schwach positiv	—	»
b) 4 Stunden nach dem Tode untersucht:			
Galle 18	eben noch positiv	positiv	negativ
» 19	schwach positiv	»	»

In zwei Fällen wurden die Gallenblasen sofort nach dem Tode abgebunden, 24 Stunden liegen gelassen und dann untersucht:

	Guajakterpentinölprobe
Galle 20	negativ
» 21	sehr schwach positiv

Endlich wurde einigemal die Leber mit der Gallenblase 24 Stunden liegen gelassen, dann erst der Ductus cysticus abgebunden und die Galle untersucht:

	Guajakterpentinölprobe	Hämochromogenprobe
Galle 22	schwach positiv	negativ
» 23	stark »	»
» 24	» »	»
» 25	» »	»

Aus vorstehenden Versuchen läßt sich mit Wahrscheinlichkeit der Schluß ziehen, daß bei Rindern in der Blasengalle unmittelbar nach dem Tode im allgemeinen ein die Guajakreaktion gebender Blutfarbstoff höchstens in Spuren vorhanden ist und man eine stark positive Guajakreaktion im allgemeinen nur bei solcher Blasengalle erhält, die infolge postmortalen Diffusionsvorgänge einen erheblichen Gehalt an Blutfarbstoff aufweist.

Hundegalle habe ich nur in einem Falle untersucht. Der Ductus cysticus wurde sofort unterbunden, die Gallenblase herausgenommen und die Galle unter den oben angegebenen Kautelen aufgefangen und geprüft. Es wurde eine durch Spuren eines Blutfarbstoffs hervorgerufene, sehr schwach positive Guajakreaktion erhalten.

Galle von Leichen¹⁾ konnte ich leider erst einige Zeit (meist 24 Stunden) nach dem Tode untersuchen. Die Gallenblasen wurden bei der Sektion sogleich abgebunden und ebenso untersucht wie die Gallenblasen von Rindern (Alkohol-Ätherfällung, Eisessigextraktion usw.):

Da sich zeigte, daß der Ausfall der Guajakprobe durchweg um so stärker positiv war, je größer der zwischen Tod und Entnahme der Gallenblase liegende Zeitraum war, so glaube ich annehmen zu dürfen, daß der fast regelmäßig beobachtete Gehalt der Galle an Blutfarbstoff ebenso wie bei der Rindergalle auf postmortale Vorgänge zurückzuführen ist. Ein Übertritt von Blut in die Galle scheint sehr leicht vorzukommen.

¹⁾ Herrn Prosektor Dr. E. Fraenkel sage ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank für die freundliche Überlassung einer größeren Anzahl menschlicher Gallenblasen.

	Guajakterpentinöl- probe	Spektroskopische (Hämochromogen-) Probe
Galle 1	stark positiv	—
» 2	negativ	—
» 3	positiv	—
» 4	stark positiv	—
» 5	» »	—
» 6	negativ	—
» 7	stark positiv	positiv, Gehalt an Hämochromogen auf 0,5% geschätzt
» 8	» »	» » 0,7% »
» 9	» »	positiv
» 10	» »	positiv, auf 0,6% geschätzt
» 11	schwach positiv	—
» 12	stark »	positiv
» 13	positiv	—
» 14	schwach positiv	negativ
» 15	sehr stark positiv	stark positiv
» 16	stark positiv	positiv
» 17	schwach positiv	negativ
» 18	sehr stark positiv	stark positiv
» 19	» » »	» »

Bei weiteren geeigneten Fällen von Gallenfistel bei Menschen werde ich die entleerte Galle in derselben Weise auf einen etwaigen Gehalt an Blutfarbstoff prüfen. Einstweilen halte ich es für wahrscheinlich, daß die menschliche Blasengalle normalerweise, wenn überhaupt, dann jedenfalls nur geringste Spuren eines Blutfarbstoffs enthält. Andererseits möchte ich es für nicht unwahrscheinlich halten, daß in pathologischen Fällen gelegentlich ein Übertritt erheblicherer Mengen von Blutfarbstoff in die Galle stattfindet.¹⁾

¹⁾ Wie ich nachträglich gefunden habe, ist schon vor längerer Zeit experimentell bei Tieren, namentlich Kaninchen, durch verschiedene blutschädigende Eingriffe ein Übertritt von Blutfarbstoff in die Galle bewirkt worden (z. B. durch Injektion von Hämoglobinlösung, Vergiftung mit Anilin, Kali chloricum, Phosphor, Arsen usw.). W. Filehne, Virchows

Die Frage, ob beim Blutnachweis mit Hilfe der einfachen Guajakreaktion (Zusatz von Guajaktinktur und Terpentinöl direkt zum Untersuchungsmaterial) durch die Gegenwart von Galle Fehler entstehen können, ist nunmehr folgendermaßen zu beantworten. In der Blasengalle kommt in geringer Menge ein vermutlich zu den Oxydationsfermenten gehöriger Stoff vor, der einen schwach positiven Ausfall der Probe verursachen kann. Diese Fehlerquelle läßt sich beseitigen, indem man entweder das Untersuchungsmaterial vor Anstellung der Probe aufkocht oder in ähnlicher Weise, wie sie oben für die Untersuchung der Galle angegeben worden ist, aus dem Untersuchungsmaterial ein saures Ätherextrakt herstellt und an diesem die Reaktion ausführt. Ist aber dem Untersuchungsmaterial blutfarbstoffhaltige Galle beigemischt, so kann natürlich ein etwaiger positiver Ausfall der Guajakprobe darauf zurückzuführen sein. Inwieweit hierdurch in klinischen Fällen Fehler entstehen können, hängt davon ab, ob *intra vitam* häufiger ein Übertritt von Blutfarbstoff in die Galle vorkommt, und läßt sich vorläufig nicht sicher entscheiden. Eine größere praktische Bedeutung hat die Frage für den Nachweis von Blutfarbstoff in den Faeces und im Magensaft. Meine bei sehr zahlreichen Faecesuntersuchungen gewonnenen Erfahrungen sprechen freilich nicht dafür, daß *intra vitam* häufiger erheblichere Mengen von Blutfarbstoff in der Galle vorkommen. Immerhin dürfte es sich empfehlen, bei der Ausarbeitung von Methoden zum Nachweis von Blutfarbstoff in den Faeces die Empfindlichkeit nicht gar zu weit zu steigern. Eine neuerdings von Schlesinger und Holst¹⁾ in Vorschlag ge-

Archiv, Bd. CXXI, 1890, S. 605, Der Übergang von Hämoglobin in die Galle. — E. Wertheimer und E. Meyer, zitiert nach Filehne. — R. Stern, Virchows Archiv, Bd. CXXIII, 1891, S. 33, Über das Auftreten von Oxyhämoglobin in der Galle. — Stern untersuchte ferner in einer größeren Anzahl von Fällen menschliche Galle, die 8 bis 48 Stunden (meist 24) nach dem Tode entnommen worden war, spektroskopisch und fand sie in vielen Fällen bluthaltig. Stern konnte nicht entscheiden, ob in diesen Fällen die Galle auch schon während des Lebens blutfarbstoffhaltig gewesen war.

¹⁾ E. Schlesinger und F. Holst, Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von Minimalblutungen in den Faeces nebst einer

brachte Modifikation der Adlerschen Benzidinprobe, die in einzelnen Fällen die von mir ausgearbeitete recht empfindliche Modifikation der Weberschen Probe an Empfindlichkeit noch um das Fünffache übertrifft, streift meines Erachtens die Grenze des Zulässigen, wenigstens so lange nicht unzweifelhaft festgestellt ist, daß die menschliche Galle intra vitam durchweg höchstens allergeringste Spuren eines diese Reaktionen gebenden Blutfarbstoffs enthält. — Erwähnt sei noch, daß die Gallenfarbstoffe bei der von mir angewandten Form der Guajakprobe einen positiven Ausfall nicht verursachen.

Für die Untersuchung von auf Blut verdächtigen Flecken in gerichtlichen Fällen sind von E. Schaer¹⁾ auf Grund ausgedehnter Untersuchungen die Bedingungen angegeben worden, unter denen die Guajakprobe den höchsten Grad von Zuverlässigkeit erreicht, sodaß ein Hinweis auf jene Arbeiten genügt.

An Stelle oder neben der Guajakprobe sind die Benzidinprobe²⁾ und die Paraphenylendiaminchlorhydratprobe³⁾ empfohlen worden, letztere speziell für den Nachweis von Blutfarbstoff in den Faeces und im Magensaft. Daß für den Nachweis von Blutfarbstoff in den Faeces die Guajakprobe besser geeignet ist als die Paraphenylendiaminprobe, habe ich schon an anderer Stelle⁴⁾ hervorgehoben. Dagegen steht die letztgenannte Probe, auf wässrige Blutlösungen angewandt, der Guajakterpentinprobe an Empfindlichkeit nicht nach, vorausgesetzt, daß man die Reagenzien in folgender Reihenfolge⁴⁾ und Menge zusetzt: 2 Tropfen wässriger Paraphenylendiaminchlorhydratlösung (0,5 : 100), 1/2 ccm etwa N/2 alkoholischer Kalilauge, 1 ccm Wasserstoff-superoxyd (30/o) und danach tropfenweise 30/oige Essigsäure. Der charakteristische Farbenumschlag nach olivgrün tritt beim

neuen Modifikation der Benzidinprobe, Deutsche mediz. Wochenschrift, 1906, Nr. 36.

¹⁾ l. c.

²⁾ O. und R. Adler, l. c.

³⁾ J. Boas, Ein neues Reagens für den Nachweis okkultur Blut-anwesenheit im Mageninhalt und in den Faeces, Zentralblatt für innere Medizin 1906, Nr. 24.

⁴⁾ O. Schumm und H. Remstedt, l. c.

Zusatz der Essigsäure ein, und allmählich entsteht Rot-, Braunrot- oder Violettfärbung.

Die Benzidinprobe ist den beiden anderen Reaktionen an Empfindlichkeit überlegen; ihre Fehlerquellen sind etwa dieselben wie die der Guajakprobe. Wie ich neuerdings fand, wird die Benzidinprobe durch die Anwesenheit geringer Mengen freier Salzsäure gestört, nicht jedoch die Paraphenylendiaminprobe. Letztere Reaktion ist außerdem gegenüber Oxydationsfermenten weniger empfindlich, wie nachfolgende Beispiele zeigen:

I. Eiterhaltiger Urin. Je 5 ccm.

a) Guajakprobe: Innerhalb 2 Minuten deutlich positiv.
Kontrollprobe (gekocht): negativ.

b) Paraphenylendiaminprobe: Weder Grün- noch Rotfärbung, negativ.

II. Sputum. Je 3 ccm.

a) Guajakprobe: schwach positiv.
Kontrolle (gekocht): negativ.

b) Paraphenylendiaminprobe: negativ.

III. Stark schleimhaltiger, blutfreier Mageninhalt. Je 5 ccm.

a) Guajakprobe: positiv.
Kontrolle (gekocht): negativ.

b) Paraphenylendiaminprobe: negativ.

IV. Wässeriger Auszug aus Hafergrütze. Je 5 ccm.

a) Guajakprobe: sehr stark positiv.
Kontrolle (gekocht): negativ.

b) Benzidinprobe: sehr stark positiv.

c) Paraphenylendiaminprobe: schwach positiv, schmutzig rosa.

V. Wässerige Aufschwemmung von Weizenmehl. Je 5 ccm.

a) Guajakprobe: sehr stark positiv.
Kontrolle (gekocht): negativ.

b) Benzidinprobe: sehr stark positiv.

c) Paraphenylendiaminprobe: schwach positiv, allmählich schwach violett.

Im Gegensatz zu der Guajak- und Benzidinprobe, die mit gewissen Oxydationsfermenten intensivste Reaktionen geben, braucht man daher bei der Paraphenylendiaminprobe in klinischen Fällen auf solche Stoffe weniger Rücksicht zu nehmen. Da die Reaktion ferner durch freie HCl nicht gestört wird, leicht ausführbar und empfindlich ist, so kann man sie vorteilhaft als Vorprobe bei der Untersuchung von Magensaft verwenden, in-

dem man diesem die Reagenzien direkt zusetzt. Da es indessen noch andere Stoffe gibt, die ebenfalls positiven Ausfall der Reaktion verursachen, z. B. Eisenchlorid, so muß man, um ganz sicher zu gehen, die Probe bei positivem Ausfall an dem durch zweimaliges Ausschütteln mit Wasser gereinigten Essigsäure-Ätherextrakt des Untersuchungsmaterials wiederholen.

Die Adlersche Benzidinprobe habe ich neben den beiden anderen Proben zum Blutnachweis im Urin und Magensaft verwandt, bei Magensaft nach vorherigem Alkalisieren. Der negative Ausfall ist eindeutig, ein positiver Ausfall bedarf dagegen der Bestätigung durch Wiederholung der Reaktion an Essigsäure-Ätherextrakt. Für Urin ist die Probe nach meinen bisherigen Erfahrungen recht brauchbar. Man verwende aber nur frisch bereitete Lösungen des reinsten Benzidin (Merck). Für den Blutnachweis im Magensaft ist die Probe, wenn sie am Essigsäure-Ätherextrakt ausgeführt wird, praktisch nur in beschränktem Umfange brauchbar, da sie reichlich empfindlich ist. — Schlesinger und Holst geben an, daß sich die Benzidinreaktion in anderer Ausführungsform zum Blutnachweis im Magensaft sehr gut eignet, wenn man nämlich 10—12 Tropfen kalt bereiteter konzentrierter Benzidin-Eisessiglösung mit $2\frac{1}{2}$ bis 3 ccm Wasserstoffsperoxyd mischt und einige Tropfen vorher gekochten Magensaftes zusetzt. Diese Vorschrift nimmt aber keine Rücksicht auf den störenden Einfluß der freien Salzsäure, der sich namentlich bei geringem Blutgehalt bemerkbar macht, selbst wenn man nur wenige Tropfen Magensaft nimmt. Magensaft ist daher zunächst zu kochen und nach dem Abkühlen zu neutralisieren oder schwach zu alkalisieren (zweckmäßig mit $\frac{n}{10}$ -Kalilauge). Nach meinen bisherigen Erfahrungen ist die Benzidinprobe in dieser Form ganz brauchbar. Doch ist zu beachten, daß man sich durch das Kochen mit Sicherheit nur gegen die Fehler schützen kann, die durch (organische) Oxydationsfermente entstehen. Von einem blutfreien Magensaft, der nur 0,1 % Jodkalium enthielt und gekocht worden war, gaben dagegen schon 2 Tropfen mit 12 Tropfen Benzidin-Eisessiglösung und $2\frac{1}{2}$ ccm Wasserstoffsperoxyd eine deutlich positive Reaktion. Wurde derselbe Magensaft mit Eisessig und

Äther extrahiert, das Extrakt zweimal mit wenig Wasser gewaschen und dann mit der Guajaktinktur und Terpentinöl geprüft (modifizierte Webersche Probe), so wurde ein negatives Resultat erhalten. Demnach ist die Benzidinprobe auch in der von Schlesinger und Holst angegebenen Ausführungsform bei positivem Ausfall nicht so eindeutig wie die eben genannte Form der Guajakprobe.
