

Über eine neue Gallensäurenreaktion und über den Nachweis der Gallensäuren im Harn.

Von
Adolf Jolles.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. Ad. Jolles
in Wien.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. August 1908.)

Bekanntlich färbt sich die Cholsäure, mit Rohrzucker und Schwefelsäure erwärmt, purpurrot, eine Reaktion, die von Pettenkofer zur Erkennung der Gallensäuren eingeführt wurde und seit langer Zeit seinen Namen trägt. Mylius¹⁾ und v. Udranszky²⁾ haben nachgewiesen, daß die Pettenkofer'sche Gallensäurereaktion auf der Einwirkung des Furfurols beruht, weshalb statt des Zuckers auch Furfurol zu der Probe benutzt werden kann.

Die sehr empfindliche Pettenkofer'sche Probe mißglückt bekanntlich leicht, wenn die Temperatur bei der Reaktion etwa 80° C. überschreitet, indem dann die organischen Substanzen durch die Schwefelsäure zerstört werden und statt der roten eine schwarzbraune Verfärbung des Gemisches resultiert.

Ein wesentlicher Nachteil der Reaktion besteht auch darin, daß bekanntlich außer Gallensäuren auch Eiweißsubstanzen und noch eine große Zahl anderer Körper die Eigenschaft zeigen, sich mit Schwefelsäure und Furfurol zu färben, wodurch der Nachweis der Gallensäuren in tierischen Flüssigkeiten, besonders im Harn, erst nach einem komplizierten Trennungs- und Reinigungsverfahren der Gallensäuren überhaupt ermöglicht wird.

Die spektroskopische Untersuchung der roten Flüssigkeit läßt zwar bei Gegenwart von Gallensäuren zwei Absorptionsstreifen, und zwar einen Streifen über der Linie D und einen zweiten vor F erkennen; es ist aber zu berücksichtigen, daß

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XI.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII.

das Rot nicht immer denselben Farbenton besitzt, da es bald blutrot, bald purpurrot erscheint und bei längerer Einwirkung der Reagentien zuletzt durch Violett in Blau übergeht, wodurch das spektroskopische Bild nicht ganz einwandfrei ist.

Die neue Reaktion, die ich mir in Vorschlag zu bringen gestatte, ist gegenüber der Pettenkofer'schen Probe dadurch ausgezeichnet, daß sie nach dem Ergebnisse meiner Versuche nur für Gallensäuren charakteristisch ist und in ihrer Ausführung keine besonderen Vorsichtsmaßregeln beansprucht.

Versetzt man 2 bis 3 ccm einer verdünnten (0,1%igen) Lösung von Taurocholat oder Glykocholat mit 1 bis 2 Tropfen einer 5%igen Rhamnoselösung und fügt hierauf das gleiche Volumen, also 2 bis 3 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu, so tritt beim schwachen Kochen zunächst eine Rosafärbung auf, die bald verschwindet und nach kurzem Stehen in eine sehr schöne grüne Fluoreszenz übergeht.

Werden die gleichen Versuche mit 1%igen Lösungen von Taurocholat und Glykocholat durchgeführt, dann tritt beim schwachen Kochen zunächst eine intensive Rotfärbung auf und nach weiterem kurzen Kochen erscheint die Flüssigkeit im durchfallenden Lichte bräunlich mit einem Stich ins Rötliche, im auffallenden Lichte prachtvoll malachitgrün.

Diese schönen Reaktionen geben weder Glykokoll noch Taurin, sondern nur die Cholalsäure. Werden 2 ccm einer 0,1%igen alkoholischen Lösung von Acidum cholalicum (Merck) mit 2 Tropfen der 5%igen Rhamnoselösung und hierauf mit 2 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, dann tritt zunächst eine weiße Trübung, von ausgeschiedener Cholalsäure herrührend, auf; wird das Gemisch erwärmt, dann färbt sich die Lösung zunächst rot und nach weiterem kurzen Kochen tritt im auffallenden Lichte eine prachtvolle grüne Fluoreszenz auf.

Ein nicht ganz gleiches Verhalten zeigt die Reaktion bei Anwendung von Schwefelsäure.

Setzt man nämlich zu ca. je 2 ccm der angeführten Lösungen von Taurocholat, Glykocholat und Acidum cholalicum 1 bis 2 Tropfen der 5%igen Rhamnoselösung und 1 bis 2 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu und erwärmt, dann

tritt zunächst noch keine Reaktion auf. Setzt man jedoch weitere ca. $\frac{1}{2}$ bis 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu und erhält in schwachem Kochen, dann tritt vorerst Rotfärbung auf, die länger bestehen bleibt als bei Zusatz der Salzsäure, und in demselben Maße als die Rotfärbung beim Stehen abnimmt, nimmt die fluorescierende Grünfärbung im auffallenden Lichte zu, erreicht aber nicht denselben Grad, wie dies bei der Salzsäure der Fall ist. Die beschriebenen Reaktionen mit Salzsäure und Schwefelsäure bedingen somit zunächst das Auftreten von Rotfärbungen, welche bei der Schwefelsäure intensiver ist, jedoch bei der Salzsäure schneller der grünen Fluorescenz Platz macht.

Die Salzsäure ist jedenfalls der Schwefelsäure vorzuziehen, weil einerseits die Reaktion mit letzterer langsamer verläuft, anderseits die Schwefelsäure auch leicht störende Nebenwirkungen erzeugen kann.

Es war die Annahme sehr naheliegend, daß die beschriebene Gallensäureprobe dadurch zustande kommt, daß aus der Rhamnose durch die Salzsäure bzw. Schwefelsäure δ -Methylfurfurol gebildet wird, welches bei Gegenwart von konzentrierter Salzsäure die Fluorescenz bedingt. Ich habe in bekannter Weise Methylfurfurol durch Destillation von Rhamnose mit konzentrierter Schwefelsäure gewonnen und die Versuche mit Methylfurfurolwasser wiederholt. Versetzt man ca. 2 ccm einer 0,1 %igen alkoholischen Lösung von Cholalsäure mit 1—2 Tropfen einer sehr verdünnten (ca. 0,1 %igen) wässerigen Methylfurfurollösung und ca. 2 ccm konzentrierter Salzsäure, so tritt bei schwachem Kochen zunächst eine Rosafärbung auf, die nach kurzer Zeit verschwindet und in eine prachtvolle grüne Fluorescenz übergeht. Die Anwendung des Methylfurfurols statt der Rhamnose bietet jedoch keine Vorteile, zumal die Methylfurfurolösungen etwas gefärbt erscheinen und zum Nachweise minimaler Mengen von Gallensäuren die Fluorescenzercheinung durch geringe Nebenfärbungen beeinträchtigt wird. Allerdings geben die Methylpentosen beim Erhitzen mit Mineralsäuren eine charakteristische Gelbfärbung. Nachdem jedoch zum Nachweis sehr geringer Gallensäuremengen der Zusatz

eines Tropfens einer sehr verdünnten — etwa 0,1 %igen — Rhamnose schon genügt, so wird dadurch die Wahrnehmung der grünen Fluoreszenz nicht gestört.

Bei Lösungen ist die Helligkeit des Fluoreszenzlichtes abhängig von der Konzentration, und demzufolge ist bei sehr geringen Quantitäten von Cholalsäure die Fluoreszenz natürlich eine geringere. Nichtsdestoweniger ist die Reaktion noch eine empfindliche. Die geringste Menge von Cholalsäure, welche in 1 ccm Alkohol gelöst, mit 1 Tropfen einer 0,1 %igen Rhamnoselösung und $\frac{1}{2}$ ccm konzentrierter Salzsäure das Auftreten der Fluoreszenz noch deutlich erkennen läßt, schwankt zwischen 0,0005 und 0,0001 g. — Um die grüne Fluoreszenz schöner wahrnehmen zu können, hat sich der Zusatz von etwas Äther als sehr zweckmäßig erwiesen. Sobald nach dem Kochen mit Salzsäure die grüne Fluoreszenz sichtbar wird, läßt man zunächst erkalten, fügt hierauf 1—2 ccm Äther hinzu und schüttelt den Inhalt des Reagenzglases einmal um. Hierbei tritt die Fluoreszenz in der wässerigen Lösung erheblich intensiver hervor.

Von Wichtigkeit ist die Tatsache, daß Albuminlösungen, Harnstoff, Kohlehydrate, höhere Kohlenwasserstoffe, Säuren der Fett- und Benzolreihe — die eine rötliche Färbung bei der Pettenkofer'schen Reaktion veranlassen können — die beschriebene für Cholalsäure charakteristische Reaktion nicht liefern. Auch Cholesterin, welches mit konzentrierter Schwefelsäure und einer Spur Rhamnose eine himbeerfarbene Färbung der Flüssigkeit bedingt,¹⁾ gibt die Reaktion nicht. — Zum Nachweis der Gallensäuren im Harn werden dieselben bekanntlich nach verschiedenen Methoden isoliert, dann gereinigt und hierauf mittels der Pettenkofer'schen Reaktion nachgewiesen. Zur Identifizierung der aus dem Harn dargestellten Gallensäuren kann natürlich auch die Fluoreszenzprobe herangezogen werden. Ich gestatte mir, auf Grund zahlreicher Versuche ein einfacheres Verfahren zum Nachweis der Gallensäuren im Harn in Vorschlag zu bringen:

¹⁾ Neuberg und Rauchwerger, Salkowski-Festschrift, S. 279, 1884.

Man versetzt 50 ccm Harn mit 15 ccm einer 3%igen Caseinlösung,¹⁾ mischt gut durch und setzt hierauf tropfenweise von einer 10%igen Schwefelsäure unter fortlaufendem Umrühren so lange hinzu, bis das Casein vollständig ausgefällt ist.

Man hat darauf zu achten, daß nicht mehr Schwefelsäure zugefügt wird, als zur Ausfällung des Caseins notwendig ist.

Ich habe bei meinen Versuchen in der Regel 0,6—0,8 ccm der 10%igen Schwefelsäure verbraucht. Nunmehr wird filtriert.

Den auf den Filter befindlichen Niederschlag bringt man in ein Bechergläschen, setzt 10 ccm absoluten Alkohols hinzu und läßt bei gewöhnlicher Temperatur etwa 1 Stunde unter wiederholtem Digerieren stehen. Nunmehr wird filtriert und etwa 4—5 ccm des Filtrates in einem Reagenzglas mit 1 Tropfen einer 5%igen Rhamnoselösung und 4—5 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, zum Kochen erhitzt und etwa 1—2 Minuten in schwachem Kochen erhalten. Nach dem Erkalten der Probe fügt man zu dem Inhalte des Reagenzglases ca. 2 ccm Äther hinzu und schüttelt um. Bei Anwesenheit von Gallensäuren ist die charakteristische grüne Fluoreszenz schön wahrzunehmen.

Ich habe die Empfindlichkeit dieser Probe in der Weise geprüft, daß ich zu normalen Harnen abgewogene Mengen von Natrium taurocholicum hinzugesetzt und das beschriebene Verfahren durchgeführt habe. Ich konnte hierbei noch 0,05% Natrium taurocholicum nachweisen. In konzentrierten und namentlich in solchen Harnen, die reich an Indikan und an aromatischen Oxysäuren sind, ist die Probe weniger empfindlich, weil das alkoholische Filtrat nach dem Kochen mit Salzsäure eine solche Färbung annimmt, daß die Wahrnehmung der Fluoreszenz wesentlich erschwert wird. In solchen Fällen kann man die Reaktion viel empfindlicher gestalten, indem man das auffallende Licht durch eine Linse sammelt und auf die im Reagenzglase befindliche Lösung wirken läßt, eventuell einen Lichtkegel durch die Lösung schickt.

¹⁾ 3 g wasserlösliches Casein werden in 100 ccm destill. Wasser gelöst.
