

Literatur

1. BOYD, J. W., *Biochem. J.* 81, 434 (1961). — 2. BOYD, J. W., *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 7, 424 (1962). — 3. DECKER, L. E. und E. M. RAU, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 112, 144 (1963). — 4. FLEISHER, G. A., C. S. POTTER und K. G. WAKIM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 103, 229 (1960). — 5. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 106, 283 (1961). — 6. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61, 76 (1963). — 7. FLEISHER, G. A. und K. G. WAKIM, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61, 98 (1963). — 8. SCHWARTZ, M. K., J. S. NISSELBAUM und O. BODANSKY, *Amer. J. Clin. Path.* 40, 103 (1963). — 9. WAKIM, K. G. und G. A. FLEISHER, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis*, 61, 86 (1963). 10. WAKIM, K. G. und G. A. FLEISHER, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 61 107 (1963). — 11. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *Čsl. Gastroenterol.* 19, 39 (1965). — 12. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *Čes. lék. česk.* (im Druck). — 13. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* (im Druck) — 14. KAMARÝT, J. und Z. ZÁZVORKA, Die Geltung der simultanen Agar-Gel-Enzym-Elektrophorese in der präventiven Medizin, in: *Ergebnisse der Laboratoriumsmedizin*, Bd. II S. 185 Medicus-Verlag GMBH, Berlin (1965). — 15. ZÁZVORKA, Z. und J. KAMARÝT, LDH, MDH und GOT-Isoenzyme in der Früh-Diagnostik der Leber-, Herz- und Bluterkrankungen; in: *Ergebnisse der Laboratoriumsmedizin*, Bd. II, S. 41, Medicus-Verlag GMBH, Berlin (1965). — 16. KELLEN, J. und V. ROMANČÍK, diese Z. (im Druck).

Dr. med. Zd. Zázvorka,
Most, Palackého 1837, ČSSR

Schnellreaktion auf p-Nitrophenol im Harn zum Nachweis einer E 605-Vergiftung¹⁾

Herrn Prof. Dr. Dr. F. TIMM zum 70. Geburtstag gewidmet

Von M. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT und K. DEINZER

*Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)*

(Eingegangen am 23. September 1965)

Der p-Nitrophenol-Nachweis im Harn nach v. EICKEN wird als Schnellreaktion zum Nachweis einer E 605-Vergiftung ausgebaut. Die Arbeitszeit wird dabei von 2 Stunden auf 15 Minuten reduziert.

The detection of p-nitrophenol in urine after v. EICKEN has been developed as a rapid test for E 605 poisoning. The operation time is reduced from 2 hours to 15 minutes.

Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel „E 605“ spielen nach wie vor eine große Rolle. Sie haben auf Grund der heutigen therapeutischen Möglichkeiten eine wesentlich bessere Prognose als früher. Voraussetzung ist allerdings die schnell und sicher gestellte Diagnose. Hierfür haben SCHWERD und SCHMIDT schon 1952 eine Schnellreaktion im Blut angegeben, die auf der durch p-Nitrophenol-Na hervorgerufenen Gelbfärbung nach Spaltung des im Serum vorhandenen E 605 beruht (1). Es besteht aber die Gefahr der Täuschung durch eine unspezifische Gelbfärbung (2, 3). Sicherer und spezifischer erscheint der Nachweis von p-Nitrophenol im Harn. Schon 1951 haben MOUNTAIN, ZLOTOW und O'CONNOR darauf hingewiesen, daß im Organismus als Spaltprodukt des E 605 das p-Nitrophenol auftritt und mit der Indophenolblau-Reaktion im Urin nachweisbar ist (4). O'BRIEN (5) gibt ein Stoffwechselschema für die Kuh an, das alle bekannten Umwandlungen des E 605-Moleküls im Organismus enthält und das wohl allgemein für Warmblüter gelten dürfte; danach wird p-Nitrophenol zum Teil an Glucu-

ronsäure gepaart im Harn ausgeschieden. Daneben dürfte noch eine Kupplung an Schwefelsäure und Essigsäure vorliegen (3, 4, 6).

Für den Nachweis von p-Nitrophenol im Harn sind eine Reihe von Verfahren angegeben worden. KAISER und HAAG (2) schlagen z. B. den papierchromatographischen Nachweis des p-Nitrophenols und eine anschließende photometrische Auswertung vor. FISCHER und KLINGELHÖLLER (7) verseifen 30 ml Harn mit äthanolischer Kalilauge zwei Stunden am Rückflußkühler und prüfen in dem Ätherextrakt des angesäuerten Ansatzes dünn-schichtchromatographisch auf p-Nitrophenol und Diäthylthiophosphorsäure. v. EICKEN (3) hydrolysiert 1 ml der zu untersuchenden Harnprobe eine Stunde im sauren Milieu, extrahiert das freigesetzte p-Nitrophenol und bestimmt es über die Indophenolblau-Reaktion. ELLIOT und Mitarbeiter (8) arbeiteten ähnlich wie v. EICKEN, setzten aber bis zu 100 ml Harn ein, wodurch sie noch geringere p-Nitrophenolmengen erfassen können. Die genannten Verfahren sind sehr sicher, haben jedoch einen Zeitbedarf von einigen Stunden. Sie sind deshalb für die p-Nitrophenolbestimmung im Harn bei akuten E 605-Vergiftungen nicht ohne Modifikationen anwendbar. WEINIG hat 1956 eine

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Methode zum Nachweis von p-Nitrophenol im Harn nach Erhitzen mit Natronlauge, Extraktion im sauren Milieu und anschließender Indophenolblau-Reaktion angegeben (9):

10 ml Harn werden nach kurzem Kochen mit Natronlauge mit HCl schwach angesäuert und mit 20 ml Äther extrahiert. Nach Ablassen der wäßrigen Phase werden in den Äther einige Tropfen einer wäßrigen o-Kresol-Lösung und ein linsengroßes Stück Natrium-Amalgam gegeben. Am Boden des Scheidetrichters bildet sich mit eintretender alkalischer Reaktion eine leuchtend blaue Schicht aus.

Für einen Schnelldurchweis erscheint es vorteilhaft, wenn nur eine sehr geringe Harnmenge einzusetzen ist (v. EICKEN) und der Zeitbedarf für die Durchführung der Reaktion gering ist (WEINIG). Wir prüften deshalb, ob in Anlehnung an diese beiden Methoden p-Nitrophenol im Harn innerhalb kurzer Zeit nachweisbar ist. Dabei sollte die Empfindlichkeit möglichst erhalten bleiben, während auf eine exakte quantitative Messung bewußt verzichtet wurde.

Nach v. EICKEN wird 1 ml Urin nach Verdünnung zu 10 ml mit 2 ml konz. Salzsäure eine Stunde hydrolysiert. Nach dem Abkühlen werden 25 ml eines Lösungsmittel-Gemisches (1-proz. Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Vol. Petroläther und 1 Vol. Äther) zugesetzt und 10 Minuten in der Schüttelmaschine extrahiert. Nach kurzem Abzentrifugieren pipettiert man 20 ml der Lösungsmittelschicht ab und schüttelt sie in einem 100 ml-Scheidetrichter mit 4 ml 2*n* Ammoniak 2 Minuten lang aus. Nach 15 Minuten läßt man die wäßrige Schicht in ein Reagenzglas ab und setzt 0,5 ml einer wäßrigen ges. o-Kresol-Lösung und 0,5 ml einer frisch bereiteten Titantrichlorid-Lösung (3 ml einer 15-proz. Titantrichlorid-Lösung werden zu 50 ml mit dest. Wasser verdünnt) zu und schüttelt eine Minute kräftig bis zur Entfärbung der Lösung. — Nach Abzentrifugieren des Titanhydroxyds mißt man nach genau 30 Minuten die Extinktion bei 620 m μ in einer 1 cm-Küvette. Die quantitative Auswertung erfolgt an Hand einer Eichkurve. Ein p-Nitrophenolgehalt von 2,5 μ g/ml kann noch erfaßt werden.

Wir prüften, ob die von v. EICKEN angegebenen Bedingungen besonders hinsichtlich des Zeitbedarfes eingehalten werden müssen. Verwendet wurden Harne von Personen, die an einer E 605-Vergiftung gestorben waren oder durch entsprechende Therapie (Atropin, PAM, künstliche Beatmung) diese überlebt hatten. Die E 605-Vergiftung wurde durch Nachweis von E 605 bzw. p-Nitrophenol in Harn, Mageninhalt, Speichel oder Organen gesichert. In einigen Fällen gelang zusätzlich auch der dünnschichtchromatographische Nachweis von Diäthylthiophosphorsäure im Harn nach FISCHER und KLINGELHÖLLER (7).

In allen Harnen wurde zunächst nach der Originalvorschrift von v. EICKEN der p-Nitrophenolgehalt bestimmt:

Tab. 1

Harn-Nr.	Extinktion des Indophenolblaus bei 620 m μ	entspricht etwa μ g p-Nitrophenol/ml
1	0,58	20
2	1,80	
3	0,52	18
4	0,03	
5	0,25	8
6	0,55	19

Für unsere Versuche verwendeten wir in der Hauptsache die Harne 1, 3 und 6, die in größerer Menge zur Verfügung standen und einen etwa gleichen p-Nitrophenol-Gehalt aufwiesen. Für die folgenden Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 angegebenen Extinktions-Werte bei 620 m μ nach Durchführung der Indophenolblau-Reaktion nach v. EICKEN als Vergleichsmaßstab benutzt, wobei diese gleich 100% gesetzt wurden.

Zur Überprüfung des Verfahrens gingen wir im allgemeinen so vor, daß wir jeweils einen Schritt des Analysenganges variierten und im übrigen genau nach der Vorschrift arbeiteten.

Hydrolyse

Den größten Zeitbedarf bei dem p-Nitrophenol-Nachweis im Harn nach v. EICKEN hat die *Hydrolyse*. v. EICKEN (3) und ELLIOT (8) geben an, daß zur Bestimmung des gesamten p-Nitrophenols im Harn eine saure Hydrolyse vorgenommen werden muß, da wahrscheinlich p-Nitrophenol als Glucuronsäure-, Schwefelsäure- und Essigsäure-Ester vorliegt (s. a. WILLIAMS (10)). Die genannten Autoren führen die Hydrolyse mit *Salzsäure* durch. v. EICKEN gibt zu 1 ml Harn 9 ml Wasser und 2 ml konz. HCl und hydrolysiert eine Stunde im siedenden Wasserbad. ELLIOT versetzt bis zu 100 ml Harn mit 20 ml konz. HCl und erhitzt gleichfalls eine Stunde im kochenden Wasserbad. Die Säurekonzentration liegt also bei beiden Autoren etwa gleich. ELLIOT gibt an, daß durch Verlängerung der Hydrolysezeit bis auf vier Stunden oder durch Erhöhung der Säuremenge *keine* Verbesserung der p-Nitrophenol-Ausbeute zu erreichen war. Wir versuchten trotzdem, durch höhere Säurekonzentration Hydrolysezeit einzusparen.

Hydrolyse mit Salzsäure

Hydrolysebedingungen nach v. EICKEN bei Änderung der Hydrolysezeiten:

Unter alleiniger Veränderung der Hydrolysezeit wurden die Harne 3 und 6, sowie zum Vergleich zwei p-Nitrophenol-freie Harne (N₁ und N₂) genau nach v. EICKEN untersucht. Tabelle 2 zeigt die nach verschiedener Erhitzungsdauer erhaltenen Werte:

Tab. 2

Erhitzungsdauer in Minuten	Extinktion der Harne Nr.		
	3	6	6
120	0,62	0,66	0,63
60	0,52	0,55	0,54
45	0,50	0,52	0,51
30	0,47	0,50	0,50
15	0,44	0,40	0,41

Daraus ergibt sich, daß die Indophenolblau-Färbung — wohl durch Freisetzung einer größeren p-Nitrophenolmenge — nach länger dauernder Hydrolyse intensiver ist. Die beiden p-Nitrophenolfreien Normalharne brachten stets ein negatives Ergebnis.

Hydrolyseverlauf bei höherer HCl-Konzentration und Variation der Hydrolysezeit:

Je 1 ml/ der Harne 1, 3 und 6 wurden mit 8 ml/konz. HCl und 3 ml/ H₂O versetzt und 5, 15, 30 und 60 Minuten lang im verschlossenen Glaskolben im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde nach v. EICKEN weitergearbeitet. Die beiden Normalharne zeigten unter diesen Bedingungen keinerlei Blaufärbung. Bei Harn 3 wurde schon nach 13 Minuten Erhitzungsdauer der gleiche Extinktionswert wie unter den v. EICKENSchen Bedingungen nach 60 Minuten erhalten, während dies bei den Harnen Nr. 1 und 6 etwa 25 Minuten beanspruchte. Das verschiedene Verhalten der Harne kann daher rühren, daß p-Nitrophenol in unterschiedlichem Verhältnis an Glucuron-, Schwefel- und Essigsäure gebunden ist. Bei allen drei Harnen aber erwies es sich, daß durch eine Erhöhung der Säurekonzentration Hydrolysezeit einzusparen ist.

Hydrolyse mit Perchlorsäure

Perchlorsäure eignet sich nicht zur Hydrolyse, da hier auch in den Normalharnen nach Durchführung der Indophenolblau-Reaktion grüne bis blaue Verfärbungen auftraten, die bei der spektrophotometrischen Untersuchung Maxima bei 620 und 630 m μ aufwiesen.

Hydrolyse mit Schwefelsäure

Harn Nr. 6 wurde nach v. EICKEN aufgearbeitet, mit dem Unterschied, daß an Stelle von 2 ml/konz. HCl 2 ml/konz. Schwefelsäure verwendet wurden. Die Extinktion bei 620 m μ stieg hierdurch von 0,55 auf 0,65. Es war also bereits eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber dem Vorgehen nach v. EICKEN eingetreten.

Um die günstigsten Bedingungen einer Hydrolyse mit Schwefelsäure zu ermitteln, hydrolysierten wir Harn Nr. 6 mit wechselnden Schwefelsäurekonzentrationen und bei verschiedenen Hydrolysezeiten, wobei die Gesamtmenge des Hydrolyse-Ansatzes immer 1 ml/ Harn in 12 ml/ Gesamtvolumen betrug. Zunächst wurden die einzelnen Hydrolyse-Gemische 10 bis 15 Sekunden lang im offenen Glaskolben über der Flamme bis zum Entstehen der ersten Rauchschwaden aufgeköcht, außerdem wurde im verschlossenen Glaskolben 15, 30, 45 und 60 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen arbeiteten wir genau nach v. EICKEN weiter. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Hydrolyse-Ansatz aus 1 ml/ Harn, 7 ml/ H₂O und 4 ml/ konz. H₂SO₄ erreicht. Damit war schon beim kurzen Aufkochen über der Flamme eine um etwa 40% bessere Extinktion als mit der Original-Methode zu erzielen. Hiermit ergibt sich eine Zeitersparung von praktisch einer Stunde. Längeres Erhitzen bei hoher Schwefelsäure-Konzentration führt offenbar zu einer Zerstörung des p-Nitrophenols, da die Extinktionswerte wieder abnahmen.

Mit den Harnen Nr. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 wurde beim gleichen Vorgehen ebenfalls ein Indophenolblau mit einem Absorptionsmaximum bei 620 m μ erhalten, wobei die Extinktionen etwa 10 bis 20% über den nach der Originalvorschrift erhaltenen lagen. 10 in der gleichen

Weise aufgearbeitete E 605-freie Normal-Harne wiesen entweder keine Färbung auf oder zeigten nur eine leichte hellbraune Verfärbung.

Hydrolyse im alkalischen Milieu

WEINIG hydrolysiert die Harnproben durch Kochen mit Natronlauge, machte in seiner Diskussionsbemerkung jedoch keine näheren Angaben über Erhitzungsdauer und verwendete Natronlauge-Konzentration. Deswegen prüften wir vergleichend auch die Hydrolyse-Bedingungen und Resultate im *alkalischen* Milieu:

Je 1 ml/ der Harne 1, 2 und 3 wurden mit 8 ml/ 2 n Natronlauge versetzt und eine Viertelstunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Sodann wurde stark angesäuert und nach v. EICKEN weitergearbeitet. In allen drei Fällen trat nach Durchführung der Indophenolblau-Reaktion nur eine ganz leichte Blaufärbung auf. Daraus ist zu schließen, daß unter diesen Bedingungen gepaartes p-Nitrophenol nur in geringem Umfange gespalten wird. Wir führten dann Versuche mit Erhöhung der Laugen-Konzentration und wechselnder Erhitzungsdauer durch, wobei wir je 1 ml/ Harn einsetzten und die Gesamtmenge des Hydrolyse-Gemisches wieder auf 9 ml/ brachten. Es zeigte sich, daß selbst bei Verwendung einer hohen Natronlauge-Konzentration (1 ml/ Harn, 8 ml/ 4 n NaOH) und einer Hydrolysezeit von 60 Minuten nur etwa $\frac{1}{3}$ der nach v. EICKEN erhaltenen Extinktion zu erreichen war.

Extraktion mit organischem Lösungsmittelgemisch

Lösungsmittelgemisch

Wie LAWFOORD und HARVEY wendet auch v. EICKEN zur Extraktion des p-Nitrophenols aus dem hydrolysierten Harn eine 1-proz. Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung aus 4 Vol. Petroläther und 1 Vol. Äther an. ELLIOT (8) extrahiert mit einem Gemisch aus Äthyläther und Benzol im Verhältnis 20:80.

Wir untersuchten zunächst die Harne 3 und 6 je dreimal nach v. EICKEN, wobei lediglich an Stelle von 25 ml/ des v. EICKENSchen Lösungsmittelgemisches 25 ml/ des Lösungsmittelgemisches nach ELLIOT verwendet wurden. Mit beiden Lösungsmittelgemischen wurden völlig übereinstimmende Ergebnisse erzielt, deshalb verwendeten wir für unsere weiteren Untersuchungen wie v. EICKEN als Extraktionsmittel Isoamylalkohol-Äther-Petroläther.

Extraktionsdauer

v. EICKEN extrahiert das durch Hydrolyse freigesetzte p-Nitrophenol mit 25 ml/ des Lösungsmittelgemisches aus der sauren wäßrigen Phase durch 10 Minuten langes Schütteln.

Wir führten zunächst Versuche mit einer p-Nitrophenol-Lösung durch, die 7 μ g p-Nitrophenol pro ml/ enthielt. Zu je 1 ml/ dieser Lösung wurden 2 ml/ konz. Salzsäure, 9 ml/ H₂O und 25 ml/ des v. EICKENSchen Lösungsmittelgemisches in einen Scheidetrichter gegeben. Darauf wurde $\frac{1}{4}$ bis 10 Minuten lang geschüttelt, der Scheidetrichter 15 Minuten ruhig stehen gelassen und dann die wäßrige Phase abgetrennt; weiterer Arbeitsgang

nach v. EICKEN. Es zeigte sich, daß nach 15 Sekunden Schütteln schon $\frac{2}{3}$ des p-Nitrophenols in das Lösungsmittelgemisch übergegangen waren. Nach 30 Sekunden Schütteln ergaben sich schon die gleichen Extinktionswerte wie nach 10 Minuten dauernder Extraktion. Nach diesem Vorversuch hydrolysierten wir die Harne 3 und 6 nach v. EICKEN, extrahierten jedoch nur *eine Minute* mit dem organischen Lösungsmittelgemisch, und gingen dann weiter nach v. EICKEN vor. Dabei ergaben sich die gleichen Extinktionen wie nach der Originalmethode.

Phasentrennung nach Extraktion

v. EICKEN zentrifugiert nach Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch, um die wäßrige von der organischen Phase zu trennen. Wir stellten fest, daß ein Zentrifugieren *nicht* erforderlich ist, da sich nach vier Minuten langem Stehen im Scheidetrichter die Phasen praktisch immer vollständig voneinander getrennt hatten.

Extraktion mit 2 n Ammoniak

v. EICKEN schüttelt p-Nitrophenol aus dem organischen Lösungsmittelgemisch mit 2 n NH_4OH während zwei Minuten aus. Wir suchten auch diesen Teilvorgang zu verkürzen und stellten sowohl mit der oben beschriebenen p-Nitrophenol-Lösung (1 ml p-Nitrophenol, 2 ml HCl, 9 ml H_2O) wie auch mit je 1 ml der Harne Nr. 3 und 6 fest, daß eine Schütteldauer von 1 Minute ausreichend ist.

Phasentrennung nach Extraktion mit 2 n NH_4OH

Nach der Extraktion mit 2 n Ammoniak läßt v. EICKEN den Scheidetrichter 15 Minuten stehen, um die organische von der wäßrigen Phase zu trennen. Nach unserer Beobachtung (p-Nitrophenollösung und Harne 3 und 6) genügen 5—8 Minuten, um eine gute Trennung zu erreichen.

Reduktionsmittel

Als Reduktionsmittel zur Umwandlung des p-Nitrophenols in p-Aminophenol wählt WEINIG Natrium-Amalgam, v. EICKEN Titantrichlorid. Um diese beiden Reduktionsmittel in ihrer Wirksamkeit zu vergleichen, verwendeten wir im Analysengang nach v. EICKEN zur Reduktion die von WEINIG angegebene Menge Natrium-Amalgam. Es zeigte sich, daß der Indophenolblau-Farbstoff wesentlich langsamer gebildet wird und sich nicht so intensiv entwickelt wie mit Titantrichlorid. Deshalb ist Natrium-Amalgam für einen Schnellnachweis weniger geeignet.

Bildungsgeschwindigkeit des Indophenol

Um die nach Zusatz von Titantrichlorid und o-Kresol bis zur vollen Ausbildung des Indophenol-Farbstoffes erforderliche Zeit festzustellen, die bei v. EICKEN mit 30 Minuten angegeben wird, prüften wir mit Harn Nr. 1 nach v. EICKEN auf p-Nitrophenol und variierten die Zeit vom Zusatz des o-Kresol und Titantrichlorid bis zur Messung von 5 bis 60 Minuten. Es zeigte sich, daß die Farbe schon nach 5 Minuten praktisch voll ausge-

bildet war und während 60 Minuten kein Abfall der Extinktionswerte auftrat. Es ist also nicht unbedingt erforderlich, bis zur Messung der größten Farbtiefe 30 Minuten zu warten. Eine Erhöhung der Titantrichlorid-Menge auf das 5fache erbrachte keine schnellere Ausbildung der maximalen Farbtintensität.

Wahl einer anderen Kondensationskomponente v. EICKEN und ELLIOT verwenden zur Indophenolblau-Reaktion als Kondensationskomponente o-Kresol in wäßriger Lösung. Schon von WALDMANN und KROUSE, sowie MOUNTAIN, ZLOTOW und O'CONNOR wurde Phenol an Stelle des o-Kresol vorgeschlagen. W. PILZ (11) stellte durch vergleichende Untersuchungen fest, daß dem unsubstituierten Phenol vor p-Kresol, o-Kresol, 2,6-Diäthylphenol (1), 2,5-Dimethylphenol (1) und 3-Methyl-5-Äthylphenol (1) der Vorzug zu geben ist, weil es die größte Farbtintensität ergibt. Mit Phenol liegt das Maximum der Absorptionskurve des Indophenolfarbstoffes bei 629 m μ . Deshalb wurde bei den nachfolgenden Versuchen mit Phenol die Messung bei 629 m μ durchgeführt. Wir ersetzten in der Versuchsanordnung nach v. EICKEN (p-Nitrophenol-Lösung, Harne 3 und 6) die o-Kresol-Lösung durch die gleiche Menge einer Phenol-Lösung, die 1, 2 oder 10 g Phenol in 10 ml H_2O enthielt. Es zeigte sich, daß durch Ersatz des o-Kresols durch Phenol die gemessenen Extinktionen um 25% höher lagen, selbst wenn schon 5 Minuten nach Zugabe von Titantrichlorid und Phenol gemessen wurde. Bei Verwendung von Phenol ist allerdings mit einer weiteren Zunahme der Extinktion zu rechnen, da sich nach PILZ die volle Farbtiefe erst nach 4,5 Stunden ausbildet. Als geeignetes Reagenz erwies sich eine Lösung von 2 g Phenol in 10 ml Wasser.

Arbeitsvorschrift und Diskussion

Faßt man die gewonnenen Ergebnisse zusammen, so ist es möglich, durch Änderung der Bedingungen für den p-Nitrophenolnachweis im Harn nach v. EICKEN einen Schnellnachweis für p-Nitrophenol im Harn anzugeben. Die *Arbeitsvorschrift* lautet:

1 ml Harn, 7 ml H_2O und 4 ml konz. Schwefelsäure werden im offenen Erlenmeyerkolben auf einem Drahtnetz bis zum Auftreten der ersten Rauchschwaden etwa 15 Sek. lang gekocht. Nach dem Abkühlen werden 25 ml des Lösungsmittelgemisches (1-proz. Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Vol. Petroläther und 1 Vol. Äther) in einem 100 ml Scheidetrichter dem Hydrolyse-Gemisch zugesetzt. Sodann wird 1 Minute geschüttelt. Vier Minuten später läßt man die wäßrige Phase ab und schüttelt die organische Phase in einem neuen, sauberen Scheidetrichter mit 4 ml 2n Ammoniak eine Minute lang aus. Nach der Phasentrennung (5 Minuten) läßt man die wäßrige Schicht in ein Reagenzglas ab und setzt 0,5 ml einer farblosen wäßrigen Phenol-Lösung (2 g Phenol in 10 ml H_2O) hinzu. (Eine schon jetzt auftretende Blaufärbung kann *nicht* auf p-Nitrophenol zurückgeführt werden. Sie deutet auf die Anwesenheit von Aminophenolen, z. B. nach Phenacetinaufnahme hin.) Sodann gibt man 0,5 ml einer frisch angesetzten wäßrigen Titantrichlorid-Lösung (0,06 ml 15-proz. Titantrichlorid pro ml H_2O) zu und schüttelt eine halbe Minute kräftig bis zur Entfärbung der Lösung. Der blaue Indophenol-Farbstoff ist bei Anwesenheit von mindestens 2 μg p-Nitrophenol/ml Harn nach 5 Minuten deutlich zu erkennen.

Nach dieser Vorschrift sind für den Nachweis insgesamt etwa 15 Minuten erforderlich. Mit seiner Hilfe kann in vielen Fällen schnell die Aufnahme von E 605 wahrscheinlich gemacht werden. Selbstverständlich ist daran zu denken, daß gelegentlich auch andere Substanzen, wie z. B. Phenacetin- oder Anilin-Abbauprodukte eine positive Indophenolblau-Reaktion im Harn ergeben können

(2, 8) und daß p-Nitrophenole auch als Metaboliten anderer Verbindungen wie z. B. Chlorthion ausgeschieden werden können. Daneben schließt ein negativer Ausfall des Nachweises eine E 605-Vergiftung *nicht* aus, da bei sehr raschem Verlauf kein p-Nitrophenol mehr im Harn erscheint.

Literatur

1. SCHWERD, W. u. G. SCHMIDT, Dtsch. med. Wschr. 77, 372 (1952). — 2. KAISER, H. und TH. HAAG, Arch. Pharmaz. 289/61, 542 (1956). — 3. v. EICKEN, S., Angew. Chem., Ausg. A. 66, 551 (1954). — 4. MOUNTAIN, J. T., H. ZLOTOW and D. G. HARVEY, Indian Health Monthly 11, 88 (1950). — 5. O'BRIEN, R. D., Toxic phosphorous esters, Academic Press, New York-London (1960). — 6. ERDMANN, W. D. und L. LENDLE, Erg. inn. Med. 10, 104 (1958).

— 7. FISCHER, R. und W. KLINGELHÖLLER, Arch. Toxikol. 19, 119 (1961). — 8. ELLIOT, J. W., K. G. WALKER, A. E. PENICK und W. F. DURHAM, J. agric. Food Chem. 8, 111 (1960). — 9. WEINIG, E., Dtsch. Zschr. gerichtl. Med. 46, 269 (1957). — 10. WILLIAMS, R. T., Detoxication mechanism, S. 136, Chapman & Hall, London (1959). — 11. PILZ, W., Microchim. Acta (Wien), 383 (1958).

Priv.-Doz. Dr. Dr. Marika Geldmacher-v. Mallinckrodt
Inst. für gerichtl. Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg
852 Erlangen, Universitätsstr. 22

KURZMITTEILUNG

Einfacher Entfärbeapparat für die Disk-Elektrophorese

Von H. R. MAURER

Aus der Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA

(Eingegangen am 19. Januar 1966)

In letzter Zeit gewinnt die Disk-Elektrophorese (1), eine neuere, analytische Methode zur Trennung, Darstellung und Reinheitsprüfung von Proteinen und anderen hochmolekularen Polyelektrolyten, zunehmend an Bedeutung, weil sie sich als wesentlich empfindlicher und zumeist auch reproduzierbarer als Papier- und Stärkegelelektrophorese erweist. Weitere Vorteile liegen in der Vielseitigkeit hinsichtlich der Trennmöglichkeit von Proteinen verschiedenster Größe und Gestalt, im kurzen Zeitaufwand und für die Auswertung in der Transparenz der Polyacrylamidgele. Wenn auch zur Zeit noch keine statistisch gesicherten Reihenuntersuchungen größeren Ausmaßes vorliegen, so sind doch die bislang gewonnenen Ergebnisse bei der Diagnose von Makroglobulinämie (2,7), Differentialdiagnose von multiplem Myelom und Waldenströmscher Makroglobulinämie (7, 10), Paraproteinämie (3), Plasmozytom (2, 4, 7), zystischer Pankreasfibrose (5), rheumatischem Fieber mit Pankarditis (6), Tuberkulose (6), genuiner Pneumonie (6), Polyneuritis (8, 9), u. a. vielversprechend.

Zum Sichtbarmachen der mittels Disk-Elektrophorese getrennten Proteine werden die Gele zumeist mit Amido-Schwarz gefärbt. Entfärben kann man durch erschöpfendes Auswaschen des Farbüberschusses oder durch Elektrophorese des ungebundenen Farbstoffes.

Vor- und Nachteile beider Methoden sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1
Vergleich der Entfärbemethoden

Methoden	Vorteile	Nachteile
Einfaches Auswaschen (durch Diffusion)	Erhaltung schwach fixierter Proteine	Zeitaufwand; Untergrundfärbung nicht immer entfernbar, dadurch Erschwerung der densitometrischen Auswertung
Elektrophorese des ungebundenen Farbstoffes	Rasche, vollkommene Entfärbung (20—40 Min.)	Verlust schwach fixierter Proteine; graduelle Abnahme der Farbtintensität und Erhöhung des elektr. Widerstandes durch Gasblasenbildung möglich

Systematische Untersuchungen mit basischen Proteinen relativ kleinen Molekulargewichtes (Histonen) haben ergeben, daß zur genügenden Färbung und Fixierung in 1-proz. Amidoschwarzlösung (20% Äthanol, 7% Eis-