

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

Die Betaninurie

Nachweis und gerichtsmedizinische Bedeutung*, **

Von

M. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und K. MENDNER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 22. Februar 1965)

LAUR machte 1949 darauf aufmerksam, daß sich bei manchen Menschen nach Genuß von Roten Rüben (*Beta vulgaris*) eine Rotfärbung des Harnes einstellt. 1956 kamen ALLISON und McWHIRTER auf Grund von Familienuntersuchungen zu der Ansicht, daß es sich bei der Fähigkeit zur Ausscheidung eines roten Farbstoffes nach Rote Rüben-Genuss um eine genetisch bedingte Eigenschaft handeln müsse, wobei der Erbgang recessiv-autosomal sei. SALDANHA u. Mitarb. fanden 1960 unter der brasilianischen Bevölkerung eine Ausscheiderhäufigkeit von 30 bis 44 %, wobei sie eine gewisse Rassenabhängigkeit annahmen. 1961 führten auch sie Familienuntersuchungen durch, aus denen sie ebenfalls auf einen rezessiv-autosomalen Erbgang der Ausscheidereigenschaft schlossen.

Nach diesen Ergebnissen erschien das Phänomen in verschiedener Hinsicht für die gerichtliche Medizin interessant:

Bei Zutreffen des angenommenen Erbganges könnte es nach ausreichender Sicherung ein neues Untersuchungsverfahren zum Vaterschaftsausschluß darstellen.

Der Nachweis des roten Farbstoffes im Harn kann zur Klärung der Frage beitragen, welche Mahlzeiten innerhalb eines gewissen Zeitabschnittes eingenommen wurden.

Daneben könnte der Farbstoff-Nachweis in Harn unbekannter Herkunft Hinweise auf einen bestimmten Personenkreis geben.

In der forensisch-toxikologischen Praxis kommen oft Harne zur Untersuchung, die einen roten Farbton aufweisen, wodurch der Verdacht auf die Anwesenheit bestimmter Medikamente gelenkt wird. Hier könnte bei negativem Arzneimittel-, Hämoglobin- und auch Porphyrin-Nachweis eine befriedigende Erklärung für die Rotfärbung der Harnprobe gegeben werden.

* Herrn Prof. Dr. A. PONSOLD zum 65. Geburtstag gewidmet.

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

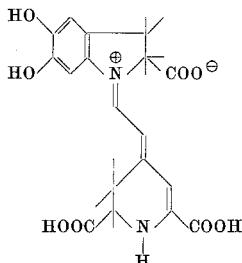
Gerichtsmedizinisch und auch klinisch wäre schließlich daran zu denken, daß Ausscheider zu Simulationszwecken Rote Rüben essen, um einen pathologischen Harn vorzutäuschen.

Die Frage, wodurch die Rotfärbung des Harnes nach Genuß von Roten Rüben hervorgerufen wird, ist bisher nicht genauer untersucht worden. Man nahm vielmehr an, daß sie durch das Betanin, den Farbstoff der Roten Rüben, bedingt sei.

Zur Beurteilung der Brauchbarkeit des Phänomens der Betaninurie innerhalb der genannten Fragestellungen erschien es deshalb zunächst wichtig zu klären, wodurch die Rotfärbung des Harnes nach Rote Rüben-Genuß hervorgerufen wird. Außerdem mußte die Richtigkeit des angenommenen Erbganges geprüft werden.

Eigenschaften des Betanins

Die ersten klassischen Untersuchungen über das Betanin stammen aus dem Jahre 1918 von SCHUDEL. Bereits er stellte fest, daß dieser Farbstoff sich von allen anderen Blütenfarbstoffen unterscheidet. In der Folgezeit haben sich zahlreiche Forscher, darunter die Arbeitsgruppen um O. TH. SCHMIDT (1937, 1956, 1957, 1960) sowie um WYLER und DREIDING (1957, 1959 a, b, 1962, 1963) mit der Aufklärung seiner Struktur befaßt.



Strukturformel des Betanidin
(nach WYLER u. Mitarb. 1963)

SCHUDEL konnte zeigen, daß im Betanin Zucker — wie sich herausstellte, Glucose — in Glykosidbindung enthalten ist. Dies wurde später von anderen Autoren bestätigt (AINLEY und ROBINSON 1937, PUCHER, CURTIS und VICKERY 1938, REZNIK 1957, WYLER und DREIDING 1959 a, SCHMIDT, BECHER und HÜBNER 1960). Das Aglykon trägt den Namen Betanidin.

Der Farbstoff der roten Rüben ist kein einheitliches Pigment, sondern kann chromatographisch und elektrophoretisch in mindestens 11 verschiedene Farbkomponenten aufgetrennt werden, von denen einige Fraktionen gelb, andere orange und die meisten purpur gefärbt sind (ARONOFF 1948, SCHMIDT und SCHÖNLEBEN 1957, LINDSTEDT 1956, REZNIK 1955, 1957). Das Molekulargewicht soll etwa 564 betragen (WYLER u. Mitarb. 1959 a). Die wässrige rote Farbstofflösung hat ihr Absorptionsmaximum bei 538 nm (PUCHER, CURTIS und VICKERY 1938, ARONOFF und ARONOFF 1948, REZNIK 1955, WYLER u. Mitarb. 1959 b).

Bis heute ist es nicht gelungen, die Konstitution des Betanins zu klären. Sicher ist lediglich, daß es nicht mit den übrigen Blütenfarbstoffen, den Anthocyannen verwandt ist, denn im Gegensatz zu diesen enthält Betanin Stickstoff (SCHUDEL 1918, AINLEY und ROBINSON 1937, SCHMIDT 1937, PUCHER, CURTIS und VICKERY 1938, KÖHLER 1953, SCHMIDT und SCHÖNLEBEN 1956, WYLER und DREIDING 1957, SCHMIDT und SCHÖNLEBEN 1957, WYLER u. Mitarb. 1959 a, b, SCHMIDT, BECHER und HÜBNER 1960) und mehrere starke Säuregruppen (SCHMIDT und SCHÖNLEBEN 1956, LINDSTEDT 1956, WYLER u. Mitarb. 1959 b, SCHMIDT u. Mitarb. 1960). In letzten Arbeiten (1962, 1963) glauben MABRY sowie WYLER u. Mitarb., für Betanidin die wiedergegebene Formel annehmen zu können.

Schon SCHUDEL stellte fest, daß sich Betanin nicht nur hinsichtlich seines Stickstoffgehaltes, sondern auch in wesentlichen anderen Eigenschaften grundlegend

von den anderen Blütenfarbstoffen (Anthocyanan) unterscheidet. So ergab Betanin in saurer Lösung nicht beim Zusatz von Soda einen Farbumschlag nach violett oder blau, es wurde vielmehr unter Bildung einer schmutzig-braunen Farbe zerstört. AINLEY und ROBINSON (1937) fanden, daß nach Zugabe von Natronlauge zu einer wäßrigen Betaninlösung ein Farbumschlag nach gelb erfolgt, jedoch durch sofortiges Ansäuern die ursprüngliche rote Farbe zum großen Teil wiedererhalten werden kann. Dieser Befund wurde 1953 von KÖHLER bestätigt.

Betanin löst sich am besten im Wasser, leicht löslich ist es auch in verdünnter Essigsäure, schwer löslich in Eisessig und Methanol, völlig unlöslich in Äthanol, Propanol, Essigester, Chloroform, Dioxan, Tetrahydrofuran, Cyclohexan und Benzol (KÖHLER 1953).

Der Farbstoff ist bereits in relativ reiner, teilweise sogar in kristallisierter Form dargestellt worden (SCHUDEL 1918, PUCHER, CURTIS und VICKERY, WYLER und DREIDING 1957, SCHMIDT und SCHÖNLEBEN 1956).

Nachweis von Betanin im Harn nach Genuß von Roten Rüben

Bei unseren eigenen Arbeiten suchten wir zunächst die Natur des roten Farbstoffes zu klären, der nach Genuß von Roten Rüben im Harn auftritt. Hierüber lagen bisher keine eingehenderen Untersuchungen vor. Lediglich ALLISON und McWHIRTER erwähnten, daß das Absorptionsmaximum des nach Rote Rüben-Genuß rot gefärbten Urins mit dem von PUCHER u. Mitarb. für Betanin angegebenen übereinstimme. BERND und SCHIRMER (1959) machten darauf aufmerksam, daß sie mit Hilfe von Ionenaustauschern auch in Leerurinen einen Farbstoff nachweisen konnten, der das gleiche Absorptionsmaximum wie der Farbstoff der Roten Rübe besitzt.

Das Ziel unserer Arbeiten war es zunächst, den Farbstoff aus dem Harn zu isolieren, zu identifizieren und eine einfache und spezifische Nachweismethode zu entwickeln.

Hierbei gingen wir von dem Harn starker Ausscheider aus, die abends 250 g frische rohe oder gekochte Rote Rüben aufgenommen hatten, und den Morgenharn zur Untersuchung brachten. Die Isolierungsversuche erschienen auf Grund der großen Wasserlöslichkeit des Betanins und seiner Unlöslichkeit in fast allen organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht mischbar sind, schwierig. Übliche Verfahren wie Ausschütteln des Harnes mit organischen Lösungsmitteln kamen daher nicht in Frage.

Das von ARONOFF und ARONOFF angegebene Verfahren zur Konzentrierung von Rote Rüben-Saft durch Aceton erwies sich für die im Harn vorliegenden geringen Konzentrationen als ungeeignet. Dagegen war die Anreicherung mit Bleiacetat, die von AINLEY und ROBINSON erstmals angegeben und von PUCHER, CURTIS und VICKERY ausführlich beschrieben wurde, anwendbar. Hiermit ließ sich eine Reinigung des

Farbstoffes erreichen und eine im Vergleich zum Urin auf etwa das Vierfache angereichertes alkoholische saure Farbstoffflösung gewinnen:

200 ml Ausscheiderharn (filtriert) wurden mit 25—30 ml einer 30%igen Bleiacetatlösung versetzt. Es bildete sich sofort ein großflockiger, blaßrosa Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Die überstehende Flüssigkeit hatte ihre ursprüngliche rote Farbe vollständig verloren und wurde verworfen. Der Niederschlag wurde sodann gründlich 3—4mal mit destilliertem Wasser und zweimal mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde einmal mit 10 ml und weitere 4—5mal mit je 20 ml einer 4%igen Lösung von konz. HCl in Methanol extrahiert. Der erste Extrakt (10 ml), der eine gelbe bis schmutzig rotbraune Farbe aufwies und viele aus dem Harn stammende Verunreinigungen enthielt, wurde verworfen. Die

Extrakte 2—4 waren intensiv blauvioletts und in der Regel fast gleich stark gefärbt. Von dem 5. Extraktionsschritt an sank die Tönung der Lösung stark ab.

Die von PUCHER, CURTIS und VICKERY weiter vorgeschriebene Behandlung der Extrakte mit peroxydfreiem Äther erwies sich bei uns nicht als geeignet. Vielmehr gaben wir die HCl-Methanol-Extrakte auf eine mit saurem Aluminiumoxyd (KÖHLER 1953) gefüllte Säule. (Wir verwendeten Aluminiumoxyd sauer der Firma Guiliini, Ludwigshafen.) Hierbei tropfte zunächst eine gelbliche Flüssigkeit ab. Der Farbstoff wan-

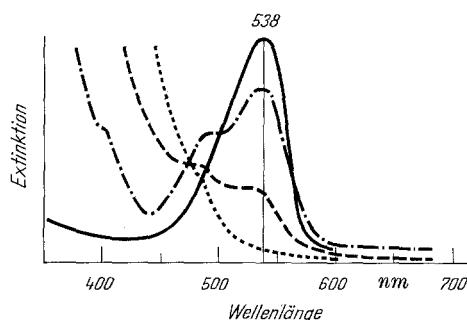


Abb. 1. Absorptionskurven von Leer-Urin, Ausscheider-Urin, HCl-Methanol-Extrakt aus Ausscheiderharn und wässriger Betaninlösung. ----- Leer-Urin,
— Ausscheider-Urin, - - - HCl-Methanol-
Extrakt, — Betanin

derte als blauviolette Zone langsam nach unten. Darüber war eine orangebraun gefärbte Fraktion zu erkennen, bei der es sich um Harnbestandteile handelte. Sobald die violette Fraktion abtropfte wurde sie aufgefangen. Auf diese Weise erhielten wir 30 ml einer intensiv gefärbten und schon weitgehend gereinigten Lösung.

Da jedoch die erhaltene Farbstoffkonzentration für papierchromatographische und elektrophoretische Untersuchungen nicht ausreichend war, engten wir hierfür die Lösung im Vakuum bis auf ein Volumen von 1—2 ml ein. Damit erfolgte gegenüber dem Ausgangsvolumen eine Anreicherung auf das 100—200fache. Die verbleibende klare Flüssigkeit war dunkelrot gefärbt und konnte nun zur Identifizierung des Farbstoffes verwendet werden.

Die Untersuchung der Farbstofflösung erfolgte spektrophotometrisch, papierchromatographisch sowie elektrophoretisch.

a) Spektrophotometrische Untersuchung

Abb. 1 zeigt das Ergebnis der spektrophotometrischen Untersuchung von Harn vor dem Genuss von Roten Rüben, Ausscheiderharn nach Genuss von Roten Rüben, dem HCl-Methanol-Extrakt nach Bleiacetattfällung und weiterer Aufarbeitung, sowie von reiner wässriger Betaninlösung. Man erkennt, daß der Ausscheiderharn gegenüber dem Leerharn

ein deutliches Maximum bei 530 nm aufweist (vgl. auch ALLISON und McWHIRTER), der HCl-Methanol-Extrakt aus Ausscheiderharn aber bereits, wie die reine Betaninlösung, ein Absorptionsmaximum bei 538 nm besitzt.

Die Absorptionsmaxima der Harne von fünf starken Ausscheidern vor und nach Genuß von Roten Rüben sowie nach Durchführung des Verfahrens zur Isolierung des roten Farbstoffes sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle. Spektrophotometrische Meßergebnisse im Harn vor und nach Genuß von Roten Rüben

Versuchs- person	Absorptionsmaxima im Leerharn		Absorptionsmaxima im Ausscheiderharn	
	unbehandelt nm	HCl-Meth.-Extr. nm	unbehandelt nm	HCl-Meth.-Extr. nm
A	—	486	486, 537	405, 492, 539
B	484	398, 482	450, 472, 530	398, 488, 538
C	—	484	478, 526	489, 538
D	489	487	484, 530	488, 537
E	—	486	446, 471, 524	398, 483, 535

b) Papierchromatographische Untersuchung

Wir verwendeten das von REZNIK (1957) angegebene Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser-Gemisch (10:2:3) und Filterpapier Nr. 2043 der Firma Schleicher & Schüll. Bei dem aufsteigenden Verfahren genügten als Laufzeit 2—4 Std. Der R_f -Wert betrug bei frisch angesetztem Laufmittelgemisch für Betanin 0,15—0,20, für Betanidin 0,35—0,40. Als Testsubstanzen dienten kristallisiertes Betanin (K-Salz des Glykosids) und Betanidin (Hydrochlorid des Aglugons), die uns freundlicherweise von Herrn Prof. O. TH. SCHMIDT, Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurden, sowie ein im Handel erhältlicher Rote Rüben-Saft (SCHÖNEBERGERS Beteasaft der Firma W. Schöneberger). Die Reinsubstanzen Betanin und Betanidin waren in Wasser gelöst. Aufgetragen wurden 0,01 ml des aus dem Ausscheiderharn gewonnenen Extraktes.

Es zeigte sich, daß der aus dem Harnextrakt gewonnene Farbstoff mit dem gleichen R_f -Wert wanderte wie reines Betanin. Auch der Farbstoff aus dem Rote Bete-Saft besaß den gleichen R_f -Wert.

Zur Sicherung dieses Befundes untersuchten wir die gleichen Substanzen auch in 4%iger Essigsäure als Laufmittel. Hierbei ergab sich, daß der aus dem Ausscheiderharn isolierte Farbstoff mit einem etwas geringeren R_f -Wert wanderte als die Testsubstanzen Betanin und der Farbstoff aus dem Rote Rüben-Saft.

Aber auch reines Betanin, das Leerharnen zugesetzt und nach dem oben beschriebenen Verfahren wieder isoliert worden war, zeigte das

gleiche Verhalten. Man darf also annehmen, daß eine geringfügige Veränderung am Molekül durch die Aufarbeitung erfolgt.

Bei der Untersuchung von Leerharn-Extrakten konnten wir in keinem der beiden Laufmittelgemische eine violette Farbzone beobachten.

c) Papierelektrophoretische Untersuchung

LINDSTEDT machte 1956 den Vorschlag, die Elektrophorese in der Praxis dazu zu benützen, Zusätze von Rote Rüben-Saft zu Fruchtsäften zu entdecken, da von den Fruchtfarbstoffen nur die Betanine in schwach saurer Lösung zur Anode wandern. Einen ähnlichen Vorschlag machten auch SCHMIDT und SCHÖNLEBEN (1956). Bei unseren papierelektrophoretischen Untersuchungen im sauren Milieu (Acetatpuffer nach WALPOLE pH 7, Citratpuffer nach SÖRENSEN pH 3, Glykokoll-Salzsäurepuffer nach SÖRENSEN pH 3) stellten wir fest, daß der aus Harn isolierte rote Farbstoff nur eine geringe Wanderungstendenz zur Anode aufwies, während die Testsubstanzen (reines Betanin bzw. der Farbstoff aus Rote Bete-Saft), wie in der Literatur beschrieben, deutlich zur Anode wanderten. Eine sehr geringe anodisch gerichtete Wanderungstendenz zeigte aber auch Leerurin zugesetztes und nach unserem Verfahren isoliertes Betanin. Die Ursache für dieses Verhalten muß in einem Angriff am Molekül an einer bestimmten Stelle des Aufarbeitungsganges liegen. Wir konnten feststellen, daß reines Betanin, in salzaurem Methanol gelöst und im Vakuum eingeengt, bei der Elektrophorese weniger anodenwärts wanderte, als gleichzeitig aufgetragenes Betanin in HCl-Methanol. Aus wäßriger Lösung mit Bleiacetat gefälltes und mit 4%igem HCl-Methanol extrahiertes Betanin wandert deutlich zur Anode, wenn die Lösung nicht vorher durch Vakuumdestillation konzentriert worden war.

Hieraus ergibt sich, daß das aus Harn isolierte Betanin nicht durch die Körperpassage, sondern durch die Konzentrierung mittels Vakuumdestillation so verändert worden war, daß es sich bei der elektrophoretischen Untersuchung leicht abweichend verhielt.

Auf Grund des Ergebnisses der spektrophotometrischen, papierchromatographischen und elektrophoretischen Untersuchungen ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem mit dem Harn ausgeschiedenen roten Farbstoff nach Genuß von Roten Rüben (in gekochter oder roher Form) um Betanin und nicht um Betanidin oder ein anderes Abbauprodukt handelt. Wir fanden bei allen von uns untersuchten starken Ausscheidern nach Genuß von Roten Rüben Betanin im Harn.

Vorproben und Schnellnachweis für Betanin im Harn

Das geschilderte Verfahren zur Isolierung und zum Nachweis des Betanin im Harn hat den Nachteil, daß es nur bei mittelstarken bis

starken Ausscheiderharnen anwendbar ist. Außerdem ist es langwierig und für Routineuntersuchungen wenig geeignet.

Die in der Literatur für Betanin angegebenen Farbreaktionen sind größtenteils unspezifisch und lassen sich auch wegen der Verunreinigung durch Harnbestandteile im Ausscheiderharn nicht durchführen.

Dagegen kann die Eigenschaft des Betanins, im alkalischen Milieu einen gelben Farbton anzunehmen und bei Ansäuern wieder rot zu werden (AINLEY und ROBINSON, KÖHLER), als schnell durchführbare Vorprobe dienen:

Etwa 5 ml roter Ausscheiderharn werden mit wenigen Tropfen einer starken Natronlauge (etwa 6 n) versetzt. Die Farbe schlägt bei Anwesenheit von Betanin sofort nach citronengelb um. Bei Zugabe von konz. HCl bis zur sauren Reaktion färbt sich der Urin wieder rot. Bei sehr schwachen Ausscheiderharnen ist dieser Test allerdings nicht brauchbar, da auch Leerharn bei Zugabe von Natronlauge einen intensiveren gelben Farbton annimmt.

Als außerordentlich empfindliches Anreicherungs- und Testverfahren (noch der Genuß von 2 Scheiben Roter Rüben konnte bei einem starken Ausscheider festgestellt werden) erwies es sich, den filtrierten Harn ohne weitere Vorbereitung auf eine mit saurem Aluminiumoxyd gefüllte Säule zu geben. Der Farbstoff wandert in einer relativ scharf begrenzten blauvioletten Zone langsam nach unten, während ein Teil der normalen Harnbestandteile darüber in einer schmalen, scharf begrenzten, schmutzigbraun gefärbten Zone abgetrennt wird.

Unterscheidung des Betanin von anderen den Harn rot färbenden Substanzen

a) Rotfärbung alkalischer Harne durch Medikamente

Da Betanin seine rote Farbe nur in neutraler oder saurer Lösung beibehält, scheiden differentialdiagnostisch von vornehmerein alle Rotfärbungen in alkalischen Harnen aus. Hierunter fallen z. B. alle Medikamente, die Phenolrot (Umschlagspunkt pH 7—8) oder Phenolphthalein (Umschlagspunkt pH 8—10) enthalten (Laxin, Agarol, Purgiolax. usw.).

b) Rotfärbung saurer Harne durch Medikamente

Von Medikamenten, die einen sauer reagierenden Harn rot färben, prüften wir Prontosil und Pyridium (ein Harnantisepticum gleichfalls aus der Gruppe der Sulfonamid-Farbstoffe).

Wir untersuchten Urine, die nach Einnahme dieser Medikamente rot gefärbt waren, in der gleichen Weise wie Betanin-haltige Harne und stellten fest, daß die beiden Farbstoffe an Bleiacetat nicht quantitativ gebunden werden.

Beim Waschen des Bleiacetatniederschlages mit Wasser und Aceton werden sie teilweise gelöst. Mit HCl-Methanol sind rot gefärbte Extrakte zu gewinnen, die durch Vakuumdestillation eingeengt wurden.

Spektrophotometrie. Die roten Farbstofflösungen aus Harnen nach Prontosil bzw. Pyridium-Einnahme ergaben einander ähnliche Absorptionskurven im sichtbaren Bereich. Die Maxima lagen dicht beieinander (448 und 438 nm) und unterschieden sich deutlich von dem Absorptionsmaximum des Betanin.

Bei der *papierchromatographischen* Untersuchung war gleichfalls eine deutliche Unterscheidung gegenüber Betanin möglich. In dem Extrakt aus Harn nach Prontosil-Einnahme waren in dem Laufmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser drei, in 4%iger Essigsäure eine gelbe Fraktion nachweisbar. Nach Pyridium-Einnahme fanden sich nach Auftrennung in dem ersten Laufmittelgemisch vier gelb-orange bis rot-orange gefärbte Fraktionen, mit 4%iger Essigsäure konnten eine gelbe und eine orange gefärbte Zone festgestellt werden. In keinem Falle war eine Verwechslung mit dem violettblau gefärbten Betanin möglich.

Bei Zugabe von Natronlauge (*Vorprobe*) änderte sich weder die Farbe des durch Pyridium noch durch Prontosil rot gefärbten Harnes. Bei Ansäuern mit konz. Salzsäure wird der Prontosil-Harn geringfügig dunkler, während beim Pyridium-Harn sofort ein dunkelroter, fast schwarzer grobflockiger Niederschlag ausfällt.

Bei Durchlaufen durch die *Aluminimumoxydsäule* trennten sich aus Prontosil-Harnen zwei Fraktionen ab, von denen die obere grau, die untere gelb-orange gefärbt war. Bei Pyridium-Harn erschien ein relativ breiter violetter Streifen. Nur hier wäre u.U. eine Verwechslungsmöglichkeit mit Betanin gegeben.

c) Rotfärbung durch Blut

Die Unterscheidung von Blut ist sehr einfach, da die Benzidin-Probe im durch Betanin gefärbten Harn stets negativ ausfällt, sofern er nicht neben Betanin auch noch Hämoglobin enthält. Bei der Bleiacetatafällung wird Hämoglobin vollständig mitgefällt. Der erste Methanol-Salzsäureextrakt ist dunkelgrau-braun gefärbt, die Farbintensität der weiteren Extrakte nimmt sehr schnell ab. Bei der Vakuumdestillation scheidet sich reichlich flockiger Niederschlag ab. In der überstehenden Lösung ergibt sich bei der spektrophotometrischen Untersuchung der typische Kurvenverlauf des Hämoglobins. Auch papierchromatographisch ist eine Unterscheidung zu Betanin sehr leicht zu treffen, da in Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser eine braun-graue Zone mit der Laufmittelfront steigt, in 4%iger Essigsäure dagegen am Start liegen bleibt.

Setzt man Hämoglobin-haltigem Harn einige Tropfen Natronlauge zu, so wird er sofort grünlich-gelb. Diese Farbe verschwindet bei Zusatz von konz. HCl nicht. Beim Durchlauf eines solchen Harnes durch eine Aluminiumoxydsäule bildet sich keine scharf begrenzte Zone aus, vielmehr wandert das Hämoglobin diffus verteilt.

Genetische Untersuchungen zur Betaninurie

ALLISON und McWHIRTER sowie SALDANHA u. Mitarb. hatten für die Betaninurie einen recessiv autosomalen Erbgang angenommen. In dem von SALDANHA gesammelten Familienmaterial blieben allerdings trotz Wiederholung des Versuches 2 Familien, bei denen beide Eltern starke Betanin-Ausscheider, jedoch je ein Kind Nichtausscheider waren. Zur Erklärung dieser Unstimmigkeiten kann man an eine Illegitimität denken, es ist aber auch möglich, daß bei der von SALDANHA u. Mitarb. (1960, 1961) gewählten einfachen Untersuchungsanordnung eine Unterteilung in Ausscheider und Nichtausscheider nicht eindeutig erfolgen

konnte: SALDANHA ließ seine Versuchspersonen 100 g Rote Rüben essen und beurteilte den Harn vor und 5 Std nach der Mahlzeit nur visuell.

Wir führten deshalb Versuche mit insgesamt 60 erwachsenen Personen durch, die Leerharn sammelten, abends 250 g Rote Rüben aßen und auch den Morgenharn zur Untersuchung brachten. Zur Untersuchung wendeten wir das säulenchromatographische Verfahren an, indem wir je 20 ml des filtrierten Harns die Säule passieren ließen. Bei keinem der vor der Rote Rüben-Mahlzeit gelassenen Harne war hiernach eine dem Betanin entsprechende Zone zu beobachten. Bei allen starken Ausscheidern war nach der abendlichen Mahlzeit im Morgenharn Betanin deutlich als stark violette Zone in der Säule nachweisbar.

Wir konnten weiter feststellen, daß auch die bei visueller Betrachtung des Morgenharnes als Nichtausscheider eingestuften Personen nach Genuß der Roten Rüben bei der säulenchromatographischen Untersuchung des Urins eine mehr oder weniger schwach violett gefärbte Zone erkennen ließen, also offensichtlich ebenfalls Betanin, wenn auch in geringerer Menge ausschieden. Dies würde bedeuten, daß es echte Nichtausscheider nicht gibt, sondern daß sich vielmehr die genetisch bedingte Eigenschaft lediglich auf die Quantität des ausgeschiedenen Farbstoffes bezöge. Selbstverständlich muß dieser Befund erst noch an einer größeren Anzahl von Versuchspersonen überprüft werden.

Zu erwähnen ist auch noch, daß bei an sich starken Ausscheidern gelegentlich plötzlich die Rotfärbung des Harns nach Genuß von Roten Rüben ausbleiben kann. Dies beobachteten bereits ALLISON und McWHIRTER sowie auch SALDANHA u. Mitarb., bei denen sich ein Kind vom „Nichtausscheider“ zum Ausscheider geändert hatte. Auch wir konnten bei 5 starken Ausscheidern, die wir über Wochen beobachteten, ein plötzliches Fehlen der Rotfärbung des Harns nach Genuß von Roten Rüben feststellen. Bei zwei dieser Fälle lag der pH-Wert des Urins im alkalischen Bereich (Cystitis). In drei anderen Fällen hatten die Versuchspersonen am gleichen Abend neben den Roten Rüben auch Tabletten eingenommen. Der Zusammenhang mit der Medikamentenaufnahme muß noch eingehend geprüft werden.

Während einerseits durch die genannten Umstände Ausscheider übersehen werden könnten, so besteht andererseits bei den genetischen Untersuchungen die Gefahr, daß eine Rotfärbung des Harns anderer Genese für eine Betaninurie gehalten wird. Bei den bisher durchgeführten Erhebungen ist auf diese Möglichkeit nicht geachtet worden.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß ein recessiv autosomaler Erbgang für die Betaninurie keineswegs als gesichert angesehen werden kann. Weitere Untersuchungen werden nur unter Einbeziehung einer quantitativen Betaninbestimmung im Harn und Berücksichtigung der Gesamt-

harnmenge sinnvoll sein, wobei u.U. der Begriff des Nichtausscheiders unter quantitativen Gesichtspunkten neu zu formulieren wäre.

Vorkommen von Betanin in anderen Pflanzen

Betanin kommt nicht nur in der Roten Rübe vor, sondern stellt nach REZNIK (1955, 1956, 1957; s. auch DREIDING 1961) das charakteristische Merkmal der großen Gruppe der Centrospermen dar. In dieser Gruppe finden sich viele rotblühende oder rotblättrige Pflanzen, darunter solche, die Betanin-haltige eßbare Teile besitzen. Auch hier wäre nach Genuß u.U. eine Rotfärbung des Harnes zu erwarten. Zu den Centrospermen gehört z.B. die Kermesbeere (*Phytolacca decandra*), deren Saft früher im Balkan und Orient zum Färben von Wein verwendet wurde. Die Pflanze ist auch bei uns heimisch. Es wäre denkbar, daß Kinder ihre an Brombeeren erinnernden, sehr stark gefärbten Früchte essen.

Auch die rote Variante der Gartenmelde (*Atriplex hortensis*), die in Notzeiten als Spinat gegessen wird, enthält Betanin, ebenso die Opuntie, die im Mittelmeerraum beheimatet ist, insbesondere die *Opuntia ficus indica*. Die Früchte dieser Feigenkaktusart werden vor allem in Italien gerne gegessen und dort ist bekannt, daß bei manchen Menschen nach Genuß Rotfärbung des Urins auftritt. Auch getrocknete südamerikanische Opuntien (*Opuntia soerensis*), die bei den Peruanern unter dem Namen „Airampu“ zum Färben von Speisen verwendet werden, enthalten reichlich Betanin.

Diskussion

Nach Genuß von Roten Rüben ist im menschlichen Urin eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung zu beobachten. Wir konnten zeigen, daß diese Färbung durch unverändertes Betanin verursacht wird. Während ALLISON und McWHIRTER sowie SALDANHA u. Mitarb. für die Betaninurie einen recessiv autosomalen Erbgang annahmen, fanden wir bei 60 untersuchten erwachsenen Personen nach Genuß von Roten Rüben stets Betanin, wenn auch in unterschiedlicher Menge, im Harn. Hiernach wäre zumindest der Begriff des Nichtausscheiders unter quantitativen Gesichtspunkten neu zu formulieren.

Betanin ist im Harn relativ einfach säulenchromatographisch nachzuweisen. Eine Unterscheidung gegen andere den Harn rot färbende Verbindungen, wie Blut und Medikamente, ist in einer Reihe von Fällen durchgeführt worden.

Eine durch Betanin bedingte Rotfärbung des Harnes ist damit in der forensisch-toxikologischen Praxis gut zu erkennen. Deshalb ist die Vorspiegelung etwa einer Hämaturie zu Simulationszwecken leicht aufzudecken. Der positive Nachweis von Betanin im Harn bedeutet, daß der Betreffende innerhalb eines gewissen Zeitraums Rote Rüben auf-

genommen hat. Unter Umständen wäre auch die Aufnahme anderer Betanin-haltiger Pflanzenteile (Kermesbeere, Opuntien usw.) in Betracht zu ziehen.

Da nach unseren Untersuchungen im sauren Harn nach Rote Rüben-Aufnahme praktisch immer Betanin nachweisbar ist, erlaubt der Nachweis von Betanin im Harn keinen Hinweis auf eine bestimmte Personengruppe.

Nachdem ein recessiv autosomaler Erbgang bisher nicht genügend gesichert erscheint, kann die Betaninurie als Untersuchungsverfahren zum Vaterschaftsausschluß vorerst nicht angewandt werden.

Zusammenfassung

Unter Betaninurie versteht man die Rotfärbung des Harnes nach Genuß von Roten Rüben durch Betanin. Während bisher zwischen Ausscheidern und Nichtausscheidern unterschieden, und ein recessiv-autosomaler Erbgang für die Ausscheidereigenschaft angenommen wurde, konnten wir bei allen untersuchten Personen nach Rote Rüben-Aufnahme Betanin im Harn nachweisen. Die Methoden für den Nachweis werden angegeben, und die gerichtsmedizinische und kriminalistische Bedeutung des Phänomens diskutiert.

Summary

Betaninuria is the excretion of beetroot pigment (Betanin) in urine following the eating of beetroots. Until now a single autosomal recessive gene has been assumed to be the controlling factor in distinguishing between excretors and nonexcretors. Contrary to previous attempts we were able to detect Betanin in urine of all examined persons after the eating of beetroots. The methods for the detection have been stated and the significance of this phenomenon to forensic medicine and criminology has been discussed.

Literatur

- AINLEY, A. D., and R. ROBINSON: Nitrogenous anthocyanins. Part III. Preliminary experiments with betanidin. *J. chem. Soc.* **1937**, 446.
- ALLISON, A. C., and K. G. McWHIRTER: Two unifactorial characters for which man is polymorphic. *Nature (Lond.)* **178**, 748 (1956).
- ARONOFF, S., and E. M. ARONOFF: Thermal degradation of dehydrated beets. II. Chromatographic separation of red beet-root pigments. *Food Res.* **13**, 59 (1948).
- BERNT, A., u. S. SCHIRMER: Zur Frage der Erblichkeit und chemischen Nachweisbarkeit der Ausscheidung des Farbstoffes der Roten Rübe. Vortrag auf der 37. Tagg. der Dtsch. Ges. für gerichtliche und soziale Medizin vom 10.—13. 9. 1958 in Zürich. *Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 184 (1959/60).
- DREIDING, A. S.: The Betacyanins, a class of red pigments in the Centrospermae. In: W. D. OLLIS, Recent developments in the chemistry of natural phenolic compounds. Oxford: Pergamon Press 1961.

- KÖHLER, W.: Über den Farbstoff der Roten Rübe. Diss. Heidelberg 1953.
- LAUR, A.: Erythrurie nach Rotrübengenuß. Dtsch. Arch. klin. Med. **196**, 466 (1949).
- LINDSTEDT, G.: Electrophoresis of the red beet pigments. Acta chem. scand. **10**, 698 (1956).
- MABRY, T. J., H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, I. PARIKH u. A. S. DREIDING: Die Struktur des Neobetanidins, 5. (vorläufige) Mitt. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. Helv. chim. Acta **45**, 640 (1962).
- PUCHER, G. W., L. C. CURTIS, and H. B. VICKERY: The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*). I. The preparation of betanin. J. biol. Chem. **123**, 61 (1938).
- — — The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*). II. A method to determine Betanin. J. biol. Chem. **123**, 71 (1938).
- REZNIK, H.: Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element. Z. Bot. **43**, 499 (1955).
- Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der chymochromen Farbstoffe. S.-B. Heidelberg. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., 2. Abh., 125 (1956).
- Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element. II. Untersuchungen über das ionophoretische Verhalten. Planta **49**, 406 (1957).
- SALDANHA, P. H., O. FROTA-PESSOA u. L. I. S. PEIXOTO: Genetik der Betanin-Ausscheidung bei holländischen Einwanderern in Brasilien. In: Second Internat. Conference of Human Genetics, Rome, D 221 (1961).
- , L. E. MAGALHAES, and W. A. HORTA: Race differences in the ability to excrete beetroot pigment (Betanin). Nature (Lond.) **187**, 806 (1960).
- SCHMIDT, O. TH.: Über den Farbstoff der roten Rübe. Naturwissenschaften **25**, 284 (1937).
- P. BECHER u. M. HÜBNER: Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe. III. Chem. Ber. **93**, 1296 (1960).
- , u. W. SCHÖNLEBEN: Zur Kenntnis des Farbstoffs der Roten Rübe. I. Naturwissenschaften **43**, 159 (1956).
- Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe (*Beta vulgaris*). II. Z. Naturforsch. **12b**, 262 (1957).
- SCHUDEL, G.: Über die Anthocyane von *Beta vulgaris* L. (var. *rapacea* Koch forma *rubra* L.) und *Raphanus sativus* L. (var. *Radicula* Pers.). Diss. Zürich 1918.
- WYLER, H., u. A. S. DREIDING: Kristallisiertes Betanin, vorläufige Mitt. Helv. chim. Acta **40**, 191 (1957).
- — Darstellung und Abbauprodukte des Betanidins, 3. (vorläufige) Mitt. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. Helv. chim. Acta **42**, 1699 (1959).
- Abbauprodukte des Betanidins, 4. (vorläufige) Mitt. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. Helv. chim. Acta **45**, 638 (1962).
- , T. J. MABRY u. A. S. DREIDING: Zur Struktur des Betanidins, 6. (vorläufige) Mitt. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. Helv. chim. Acta **46**, 1754 (1963).
- G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU u. A. S. DREIDING: Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin, 2. (vorläufige) Mitt. Helv. chim. Acta **42**, 1696 (1959).

Priv.-Doz. Dr. M. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT
Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität
Erlangen-Nürnberg
Erlangen, Universitätsstr. 22