

## Zur Identifizierung von Harn und Harnflecken mittels Dünnschichtchromatographie

H. WEINKE, F. MARTIN und B. GIBB

Institut für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Ernst-Moritz-Arndt-  
Universität Greifswald (Direktor: Prof. Dr. med. habil. E. SCHEIBE)

Eingegangen am 18. Januar 1966

Der Gerichtsarzt steht nicht selten vor der Aufgabe, einen Fleck als Harnrückstand bzw. eine Flüssigkeit als Harn zu identifizieren. Dabei besteht wie stets das Bedürfnis, mit möglichst wenig Material in kurzer Zeit eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

So wurde vorgeschlagen, kleinste Urinmengen über den Harnstoffnachweis mit der Tüpfelreaktion für Stickstoff nach FEIGL (ISHLER, SLOMAN und WALKER, 1947), mit NESSLERS Reagens getränktem Testpapier (THOMA und KUCHINKE, 1953) bzw. mit Hilfe der Papierchromatographie (THOMA, 1956) nachzuweisen oder durch den Nachweis von Aminosäuren (GELDMACHER v. MALLINCKRODT und SÖLLNER, 1956, vgl. auch WALZ, FAHMY, PATAKI, NIEDERWIESER und BRENNER, 1963) zu identifizieren.

Die Papier- und Dünnschichtchromatographie bietet sich zur Lösung einschlägiger Probleme besonders deshalb an, weil wenig Material benötigt wird und bei entsprechender Versuchsanordnung in gewissen Grenzen auch eindeutige Aussagen möglich sind. Von den charakteristischen Harnbestandteilen wurden auf diese Weise u. a. Harnstoff (KIRBY-BERRY, 1951; HÜBNER, BODE, MOLLAT und WEHNER, 1952; ADACHI, 1953), Harnsäure (BERRY, 1951; JOHNSON, 1952; KRAWCZYNSKI, 1952) und Kreatinin (PFEIL, 1957; PAUMGARTNER, KRAUPP und FISCHER, 1963; PATAKI, 1964) nachgewiesen (vgl. auch RINK, 1964). Diese Untersuchungen dienten ausschließlich klinischen Belangen.

Nachstehend berichten wir über eine Methode der Harnidentifizierung, die auf dem gleichzeitigen Nachweis von Harnstoff und Kreatinin beruht. Sie hat sich uns wegen ihrer Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit gut bewährt.

### Methodik und Ergebnisse

Die in üblicher Weise vorbereiteten Kieselgel<sup>1</sup>-Platten (RANDERATH, 1962; STAHL, 1962; BOBBITT, 1963) mit einer Schichtdicke von 0,5 mm werden nach kurzem Vortrocknen an der Luft etwa 30—40 min auf 110° C im Trockenschrank erhitzt. Man trägt 10 µl Untersuchungs-

<sup>1</sup> Kieselgel G nach STAHL für die Dünnschichtchromatographie der Fa. F. Merck AG; Darmstadt.

material sowie als Vergleichssubstanz 5 µg Kreatinin und 50 µg Harnstoff auf. Die so vorbereitete Platte wird in eine mit einem frischen Laufmittel gesättigte Kammer gebracht. Als Laufmittel dient ein Gemisch von n-Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4:1:1. Bei einer Laufstrecke von 10 cm beträgt die Laufzeit 70—80 min. Anschließend werden die getrockneten warmen Platten zunächst unter Freilassung des unteren Drittels mit einer salzauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd und dann im unteren Drittel mit einer 5%igen äthanolischen Pikrinsäurelösung und 10%iger Natronlauge (Jaffé-Reagens) besprüht. Da die Farb-

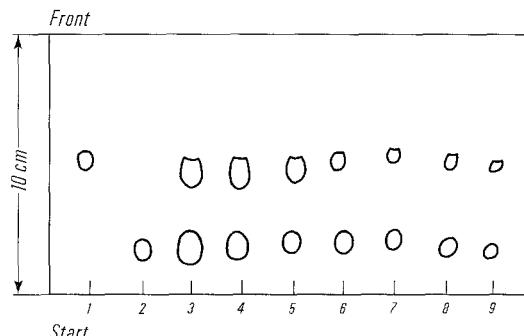


Abb. 1. Chromatographie von Kreatinin und Harnstoff im Urin. Aufgetragen wurden: 1. Harnstoff (50 µg), 2. Kreatinin (5 µg), 3. unverdünnter Urin, 4.—9. verdünnter Urin (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:9, 1:12)

intensität der Kreatininflecke im Gegensatz zu der der Harnstoffflecke schnell nachläßt, werden diese unmittelbar nach dem Besprühen gekennzeichnet.

Um die Eluierbarkeit und die Dauer der Bestimmbarkeit von Harnstoff und Kreatinin zu überprüfen, wurden unterschiedliche Materialien (verschiedene Textilgewebe, Leder, Papier, Pappe, Holz, Linoleum, Ziegelstein) mit jeweils 0,5 ml verschiedener Urinproben beschickt, bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gelagert und in unterschiedlichen Zeitabständen untersucht. Die Elution der beiden Harnkomponenten erfolgte mit wenigen ml warmen distillierten Wassers.

Tabelle 1. Analytische Daten für den Nachweis von Kreatinin und Harnstoff

	Kreatinin	Harnstoff
Farbe des Fleckes	orange	leuchtend gelb
Farbintensität	kräftig, bald ablassend	mittelkräftig; stabil
R <sub>f</sub> -Wert ( $\bar{x} \pm s$ )	$0,19 \pm 0,014$	$0,5 \pm 0,022$
Nachweisgrenze (7 verschiedene Proben)	0,5 µg	3 µg

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1—3 zusammengefaßt. Die Abbildung zeigt ein typisches Chromatogramm von Harnstoff und Kreatinin in unverdünnten und verdünnten Harnproben.

Tabelle 2. Verhalten von Kreatinin und Harnstoff in 5 Harnproben auf verschiedenen Spurträgern in zeitlicher Abhängigkeit

Nach ... Tagen	Holz		Linoleum		Papier, Pappe		Verschie- dene Textil- gewebe		Leder		Ziegelstein		
	H *	K *	H	K	H	K	H	K	H	K	H	K	
I	10	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	—	—
	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—
	21	—	—	—	—	(+)	—	(+)	—	—	—	—	—
	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III	10	+	+	+	+	+	+	+	5	+	+	(+)	(+)
	21	(+)	+	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	—	—
	40	—	—	—	—	(+)	—	(+)	—	—	—	—	—
IV	10	(+)	+	—	+	+	+	+	—	(+)	—	—	—
	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
V	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
	21	(+)	+	(+)	+	+	+	+	(+)	+	—	—	—
	40	(+)	+	—	+	+	+	+	—	(+)	—	—	—

\* H = Harnstoff, K = Kreatinin.

Tabelle 3. Nachweisbarkeit der Harnkomponenten Kreatinin und Harnstoff in Abhängigkeit vom Alter der Harnproben

		Frischer Urin	Nach 10 Tagen	Nach 21 Tagen	Nach 40 Tagen	Nach 135 Tagen
I	Harnstoff	+	+	+	(+)	—
	Kreatinin	++	++	—	—	—
II	Harnstoff	+	+	+	+	—
	Kreatinin	++	++	—	—	—
III	Harnstoff	+	+	+	—	—
	Kreatinin	++	++	++	+	—
IV	Harnstoff	+	+	+	(+)	—
	Kreatinin	++	++	—	—	—
V	Harnstoff	+	+	+	+	(+)
	Kreatinin	++	++	++	++	+

### Diskussion

Bekanntlich scheidet der Mensch in 24 Std 1—2 l Harn aus, in dem 20—35 g Harnstoff und 1,0—1,5 g Kreatinin gelöst sind (HINSBERG, 1953). Es muß demnach damit gerechnet werden, daß 1 Tropfen (0,05 ml) Harn wenigstens 0,6 mg Harnstoff und 0,02 mg Kreatinin enthält. Bei unserer Methode beträgt die Nachweisgrenze für Harnstoff 3  $\mu$ g, für Kreatinin 0,5  $\mu$ g (vgl. Tabelle 1). Da die Ausscheidung des Kreatinins im Harn, d. h. der Kreatininkoeffizient für den einzelnen Menschen ziemlich konstant und demzufolge auch unabhängig von der ausgeschiedenen Harnmenge ist (SCHAFFER, 1908; BÜRGER, 1923), müßten bei frischeren Proben nach unserem Verfahren selbst dann noch positive Ergebnisse erhalten werden, wenn Harn in einer 10—15fachen Verdünnung vorliegt. Die Praxis lehrt aber, daß die verfügbare Menge an Untersuchungsmaterial stets wesentlich größer ist. Insofern ist auch nicht von entscheidendem Nachteil, daß wir die von PATAKI bei Verwendung von Zellulose-D-Schichten für Kreatinin mit 0,4  $\mu$ g angegebene Nachweisgrenze nicht erreicht haben. Auch dürfte angesichts des Gesamtzeitaufwandes des Untersuchungsganges die etwas längere Laufzeit bei der von uns gewählten Anordnung von untergeordneter Bedeutung sein. Demgegenüber traten die von PATAKI bei der Jaffé-Reaktion beobachteten Nebenflecken bei uns nicht auf.

Durch den beschriebenen Harnstoff-Kreatinin-Nachweis kann auf Holz, Linoleum, Papier, Pappe, Leder und verschiedene Textilgewebe aufgebrachter Harn in jedem Fall bis zum 10. Tag sicher charakterisiert werden (vgl. Tabelle 2 und 3). Bei einzelnen Harnflecken gelang der Nachweis sowohl von Kreatinin als auch von Harnstoff noch am 21. bzw. am 40. Tag. Dies hängt offensichtlich mit der Zersetzbarkeit des Untersuchungsmaterials zusammen. Unbefriedigend waren die Ergebnisse, wenn es sich um Ziegelsteine als Spurenträger handelte. Dies dürfte auf die poröse Beschaffenheit des Materials und die damit im Zusammenhang stehende schlechtere Auswaschbarkeit zurückzuführen sein.

Wir möchten unser Verfahren zur Identifizierung von Harnflecken empfehlen. Da sich die Dünnschichtchromatographie inzwischen zu einer allgemein gebräuchlichen Untersuchungsmethode entwickelt hat, dürfen die technischen Voraussetzungen für ihre Anwendung in allen einschlägigen Institutionen gegeben sein.

Daß das Verfahren mit Erfolg bereits in der gerichtsärztlichen Praxis angewandt werden konnte, möge durch die beiden nachstehenden Fälle belegt werden.

*Fall 1.* W. wird mit einem Krad im öffentlichen Straßenverkehr wegen einer auffälligen Fahrweise kontrolliert. Er gab an, eine größere Alkoholmenge getrunken zu haben. 7 Std nach Trinkende wurde für das Blut ein Widmark-Wert von

1,60/oo, für „Urin“ ein solcher von 0,0/oo ermittelt. Da sich W. entsprechend der zeitlichen Angaben in der Ausscheidungsphase befunden haben muß, nahmen wir an, daß eine andere wäßrige Flüssigkeit eingesandt worden war. Die dünnenschichtchromatographische Untersuchung ließ bei entsprechenden Kontrollen weder einen Harnstoff noch einen Kreatininfleck erkennen (H. W., A 0897/65, 0898/65).

*Fall 2.* Nach einer längeren Zeichtour fiel H. durch sein ungehöriges Verhalten auf. Die Alkoholbestimmung der eingesandten Blut- und Urinprobe ergab folgende Werte: Blut 1,450/oo (WIDMARK), 1,5/oo (ADH); „Urin“ 0,450/oo (WIDMARK), 0,30/oo (ADH). Entsprechend der zeitlichen Angaben hätte H. sich in der Ausscheidungsphase befinden müssen. Bei der anschließend durchgeführten dünnenschichtchromatographischen Untersuchung der „Urinprobe“ war lediglich ein sehr blasser Kreatininfleck erkennbar. Harnstoff war nicht nachweisbar. Hieraus schlossen wir, daß die eingesandte Probe erheblich mit Wasser verdünnt worden war, was in der späteren Vernehmung bestätigt wurde (W. H., A 2354/65; 2355/65).

Die Untersuchungsergebnisse wurden im übrigen auch noch durch refraktometrische und interferometrische Messungen bestätigt.

### Zusammenfassung

Durch die gleichzeitige qualitative Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff mittels der Dünnschichtchromatographie läßt sich Urin schnell und sicher charakterisieren. Das beschriebene Verfahren eignet sich sowohl in der forensischen Spurenkunde zur Identifizierung von Urinflecken als auch zur routinemäßigen Unterscheidung von Urin und Wasser an zur Alkoholbestimmung eingesandten „Urinproben“.

Für verständnisvolle technische Mithilfe danken wir den med.-techn. Assistentinnen M. DENKER und G. LUGWIG.

### Literatur

- ACKER, L., W. DIEMAIR, D. PFEIL u. G. SCHIFFNER: Z. anal. Chem. **148**, 10 (1955).  
 ADACHI, S.: Kagaku **23**, 582 (1953); C A (N. Y.) **48**, 12214 (1954).  
 BERRY, H. K.: Univ. Texas Publ. No 5109, 84 (1951).  
 BOBBITT, J. M.: Thin-layer chromatography. New York and London: Reinhold Publ. Corp. 1963.  
 BÜRGER, M.: Klin. Wschr. **2**, 33 (1923).  
 GELDMACHER, v. MALLINCHRODT, M. u. H. SÖLLNER: Arch. Kriminol. **135**, 48 (1965).  
 HINNSBERG, K.: In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd V. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.  
 HÜBENER, H. J., F. BODE, H. J. MOLLAT u. M. WEHNER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 136 (1952); — C A (N. Y.) **48**, 10493 (1954).  
 ISHLER, SLOMAN u. WALKER: J. Ass. Offic. Agricult. Chemists **30**, 670 (47). Zit. nach THOMA.  
 JOHNSON, E. A.: Biochem. J. **51**, 133 (1952).  
 KIRBY-BERRY, H.: Univ. Texas Publ. No 5109, 88 (1951).  
 KRAWSZYNSKI, J.: Pol. Tyg. lek. **7**, 741 (1952).  
 PATAKI, G.: Schweiz. med. Wschr. **94**, 1789 (1964).  
 —, u. M. KELLER: Klin. Wschr. **43**, 227 (1965).  
 PAUMGARTNER, G., O. KRAUFP u. F. X. FISCHER: Clin. chim. Acta **8**, 960 (1963).  
 PFEIL, D.: Z. anal. Chem. **154**, 5 (1957).

- RANDERATH, K.: Dünnschichtchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1962.  
RINK, M.: Die Harnanalyse. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1964.  
SCHAFFER, P.: Amer. J. Physiol. **23**, 1 (1908).  
STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.  
THOMA u. KUCHNIKE: Neue Pol. Nr 12 (1953). Zit. nach THOMA.  
WALZ, D., A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER u. M. BRENNER: Experiencia (Basel) **19**, 213 (1963).  
WERLE, E., u. H. SCHIEVELBEIN: Die Ausscheidungen und ihre Organe. I. Niere und Harn. In: B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ, Handbuch der physiologischen Chemie, Bd. II b. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

Assistenzarzt H. WEINKE  
Apothekerin F. MARTIN  
Oberarzt Dr. B. GIBB  
Institut für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik  
22 Greifswald, Schützenstr. 14