

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Ernährung und Stoffwechselkrankheiten

Umber, Friedrich

Berlin [u.a.], 1925

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Shelf Mark: Ui VI 1900

Die im Laboratorium der Umberschen Klinik bewährte Methodik der
Stoffwechsel-Untersuchungen. Von Priv.-Doz. Dr. Max Rosenberg,
Oberarzt.

[urn:nbn:de:hbz:38m:1-126153](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:38m:1-126153)

Von Priv.-Doz. Dr. Max Rosenberg, Oberarzt.

Von Priv.-Doz. Dr. Max Rosenberg, Oberarzt.

Die im Laboratorium der Inneren Klinik
erwähnte
Methodik der Stoffwechsel-Untersuchungen.
Von Dr. Dr. Dr. Max Hosenberg, Oberarzt.

I. Stoffwechseluntersuchungen des Harnes.

A. Nachweis, Bestimmung und Unterscheidung der verschiedenen Zuckerarten.

1. Traubenzucker.

Qualitativer Nachweis:

a) Trommersche Probe: Man fügt dem zu untersuchenden Harn in einem Reagensglas etwa $\frac{1}{3}$ seines Volumens 10% ige Natron- oder Kalilauge zu und unter Umschütteln tropfenweise so viel verdünnte Kupfersulfatlösung, bis dieses sich in der Flüssigkeit nicht mehr löst, sondern in Flocken ausfällt. Falls Zucker vorhanden ist, muß erheblich mehr Kupfersulfat zugesetzt werden, bis ein Niederschlag auftritt. Nun wird bis zum Sieden erhitzt, wobei sich bei Anwesenheit von Zucker ein dicker Niederschlag von gelbrotem Kupferoxydulhydrat oder braunrotem Kupferoxydul bildet. Eiweißhaltige Harne müssen vor Anstellung der Reaktion enteiweißt werden.

Bei kleinen Zuckermengen (unter 0.5%) kann die Trommersche Probe unter Umständen negativ ausfallen.

b) Nylandersche Probe: Zu 10 cm³ Urin füge man in einem Reagens- oder Becherglas 1 cm³ Nylanders Reagens (Bismut. subnitr. 2.0, Natr. Kal. tartar. 4.0, Natronlauge 8% ad 100.0) und koche die Mischung bis zu 3 Minuten. Bei Vorhandensein von Zucker tritt ein schwarzer Niederschlag von metallischem Wismut auf. Eiweißhaltige Harne müssen vorher enteiweißt werden.

Die Nylandersche Reaktion ist feiner als die Trommersche, aber auch unspezifischer, und wird zuweilen auch beim Vorhandensein nicht kohlenhydratartiger reduzierender Substanzen (Harnsäure und Kreatinin bei sehr konzentrierten Urinen, Glykuronsäuren u. s. w.) positiv.

c) Benedicts Probe¹⁾: Zu 7 cm³ von Benedicts Reagens (reines

¹⁾ Benedict, Journ. Amer. Med. Ass. 1911, 57, 1193.

krystallinisches Kupfersulfat 17·3, Kalium- oder Natriumcitrat 173·0, wasserfreies Natriumcarbonat 100·0 [oder wasserhaltiges krystallinisches Natriumcarbonat 270·0, dieses ist leichter löslich], Aq. dest. ad 1000·0; Citrat und Carbonat werden zusammen in 700 cm^3 heißen Wassers gelöst und eventuell filtriert, dann das Kupfersulfat unter Rühren eingetragen [unbegrenzt haltbar] fügt man in einem Reagensglas 8 Tropfen Urin, schüttelt um und stellt das Reagensglas 5 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad. Aus dem Ausfall der nach dieser Zeit auftretenden Farbenreaktion läßt sich der Zuckergehalt auch ungefähr quantitativ schätzen. Bei einem solchen von 0·08–0·1% entsteht eine schwach erbsengrüne Farbe, bei ungefähr 0·5% ist die Farbe bräunlich-grün, bei 0·5–0·8% braun, bei 1% gelb und über 2% rot. Auch hier kann bei Abwesenheit von Zucker in sehr hochgestellten Urinen Kreatinin eine positive Zuckerreaktion vortäuschen. Eiweißhaltige Harne müssen enteiweißt werden. Die Benedictsche Probe hat sich uns gut bewährt, sie ist vielleicht etwas feiner als die Nylandersche.

Quantitative Bestimmung:

Diese kann erfolgen mittels der

a) Polarisation, da der Traubenzucker die Ebene des polarisierten Lichts nach rechts dreht. Die üblichen Polarimeter erlauben die Ablesung der vorhandenen Traubenzuckermenge in Prozenten. Vor Ausführung der Bestimmung muß der Harn durch Zufügen einer Messerspitze Bleiacetat und Abfiltrieren des darnach entstehenden Niederschlages entfärbt und eventuell enteiweißt werden.

b) Vergärung im Lohnsteinschen Gärungssaccharometer, in dem die durch Hefezusatz sich entwickelnde Kohlensäure die Quecksilbersäule emportreibt und der prozentuale Zuckerwert an einer dem Apparat anhaftenden Skala abgelesen wird. Kontrollen mit reiner Hefelösung und Hefe mit Traubenzuckerlösung.

c) Reduktion. Wir benutzen die titrimetrische Bestimmung nach Pavy¹⁾-Sahli²⁾, die auf der Reduktion einer Kupferlösung zu Kupferoxydul oder Kupferoxydulhydrat durch Traubenzucker beruht.

Lösungen:

1. Kupfersulfat puriss. wasserfrei....	4·158
Aq. dest.....	500·0

¹⁾ Pavy, Physiologie der Kohlenhydrate. Wien 1895, Deuticke. — ²⁾ Sahli, Deutsche med. Wochenschr. 1905, S. 1417.

2. reinstes getrocknetes Seignettesalz	20·4
Kalium hydricum puriss.....	20·4
Aq. dest.	100·0
Nach erfolgter Lösung Zusatz von	
Ammoniak (spec. Gew. 0·88).....	300·0 cm^3
Aq. dest.....ad.	500·0 cm^3

Je 5 cm^3 von Lösung 1 und 2 gemischt, entsprechen genau 10 cm^3 der ursprünglichen Pavyschen Lösung und 0·005 g Traubenzucker.

Zunächst ist der Titer der Pavyschen Lösung zu bestimmen. Dazu bereitet man sich eine 1%ige Traubenzuckerlösung und titriert damit 3mal je 10 cm^3 der gemischten Pavyschen Lösung (5 cm^3 von Lösung 1 + 5 cm^3 von Lösung 2), die mit je 30 cm^3 Wasser verdünnt sind. Das mit der verdünnten Pavyschen Lösung gefüllte Kölbchen wird auf einem weißen Asbestdrahtgeflecht bis zum schwachen, aber deutlichen Sieden erhitzt. Zu der kochenden Flüssigkeit läßt man in kleinen Mengen, so daß das Kochen nicht unterbrochen wird, die Traubenzuckerlösung aus einer Bürette zufließen und achtet genau auf die Färbung der Lösung. Sobald diese heller zu werden anfängt, verlangsamt man den Zufluß der Zuckerlösung, bis völlige Entfärbung eingetreten ist. Die Anzahl der nun verbrauchten Kubikzentimeter Zuckerlösung muß bei exaktem Arbeiten genau 5 betragen, da 10 cm^3 der Pavyschen Lösung 0·005 Traubenzucker entsprechen.

Ausführung: Der zu untersuchende Urin ist so zu verdünnen, daß sein Zuckergehalt zwischen 0·5 und 1% liegt, da die Methode am genauesten arbeitet, wenn 5–10 cm^3 Urin zur Reduktion von 10 cm^3 Pavyscher Lösung gebraucht werden. Die Verdünnung muß sehr exakt mit Pipette und Meßkolben ausgeführt werden, unter Verwendung größerer Flüssigkeitsmengen (z. B. 2:100). Man verfährt nun genau so wie bei der Feststellung des Titers, nur daß man statt der Traubenzuckerlösung den (eventuell verdünnten) Urin nimmt.

Berechnung: Bezeichnet man die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter Urin mit x , und die angewandte Verdünnung mit y , so ist der prozentuale Zuckergehalt des untersuchten Urins

$$a = \frac{0·5 \cdot y}{x}.$$

Der so erhaltene Wert kann nur mit Vorbehalt ausschließlich auf Zucker (Dextrose, Lävulose, Maltose, Milchzucker) bezogen werden, und entspricht, genauer gesagt, dem Gehalt des Urins an reduzierender Substanz.

2. Lactose.

Unterscheidet sich vom Traubenzucker dadurch, daß sie durch reine Hefe nicht vergoren wird. Dagegen reduziert sie und dreht etwa ebenso stark rechts wie der Traubenzucker. Der Schmelzpunkt ihres Osazons (s. u.) liegt etwas, dessen N-Gehalt erheblich unter dem des Traubenzuckers.

Der qualitative Nachweis der Lactose mittels der Rubnerschen Probe wird von Neuberg als unbrauchbar verworfen. Diese besteht darin, daß 10 cm^3 mit 1–2 Messerspitzen Bleiacetat versetzten Urins zum Sieden erhitzt werden und der siedend heißen Lösung tropfenweise konzentriertes Ammoniak zugesetzt wird, bis der entstehende Niederschlag beim Umschütteln nicht mehr verschwindet. Dann färbt sich die Lösung und der Niederschlag intensiv gelb, bei stärkerer Konzentration mehr rötlich.

3. Pentosen.

Die Reduktion von Kupfersulfat geht erst nach längerem Kochen schußweise vor sich (Salkowski).

Die Harnpentose ist optisch inaktiv, da es sich um eine racemische Arabinose handelt (C. Neuberg), und nicht gärungsfähig.

Der Schmelzpunkt des Osazons (s. u.) liegt erheblich niedriger als der des Traubenzuckers, sein N-Gehalt ist etwas höher. Die gelben Nadeln des Osazons sind in heißem Wasser löslich und fallen erst beim Erkalten aus, während sich die Osazonnadeln des Traubenzuckers schon in der heißen Lösung abscheiden. Am einfachsten erfolgt der qualitative Nachweis mittels der Tollenschen Orcinprobe.

Diese wird in der Modifikation von Salkowski so ausgeführt, daß man etwa 4 cm^3 Harn mit einem Körnchen Orcin und doppeltem Volumen rauchender Salzsäure erhitzt. Es tritt ganz vorübergehend Rot- oder Violettfärbung und dann eine grünliche Färbung auf. Man kühlt den Harn etwas ab, gibt etwas Amylalkohol zu und schüttelt gelinde. Der Amylalkohol nimmt dann — je nach der Menge der Pentose — hellgrüne, grasgrüne, smaragdgrüne, blaugrüne Färbung an; im Spektralapparat zeigt dieselbe einen gut ausgebildeten Absorptionsstreifen im Rot zwischen C und D, mitunter noch einen zweiten schwachen Absorptionsstreifen nach links. Wenn man den Harn mit Tierkohle entfärbt, verläuft die Reaktion besonders schön (Salkowski). Die von Bial vorgeschlagene Modifikation beruht darin, daß etwas Eisenchloridlösung zugesetzt oder das fertige Bialsche Reagens benutzt wird (Acid. mur. conc. 250:0, Orcin 0.5, Ligu. Ferri sesquichlorati gtt. 10). Die Orcinprobe ist der Tollen-

schen Phloroglucinprobe vorzuziehen, weil sie weniger leicht Täuschungen durch gleichzeitiges Vorhandensein von gepaarten Glykuronsäuren, die ja auch im normalen Urin vorkommen können (s. u.), hervorruft. Jedoch darf man nicht lange mit Salzsäure kochen, um nicht die Glykuronsäuren aus ihren Verbindungen frei zu machen, denn freie Glykuronsäuren geben auch die Orcinreaktion (s. u.). Unter Umständen können freilich auch die gepaarten Glykuronsäuren, wie P. Mayer gezeigt hat, bei Stehen des Urins zerfallen. In solchem Fall fällt auch die Orcinprobe positiv aus. Die Feststellung, ob Glykuronsäure vorliegt, kann durch Darstellung der Bromphenylhydrazinverbindung derselben geschehen, die sehr charakteristische optische Eigenschaften hat (C. Neuberg).

Die Orcinprobe ist eine außerordentlich feine Reaktion, so fein, daß die Pentosane, die der Urin bei mehrmaligem Filtrieren durch Filtrierpapier aus diesem aufnimmt, schon genügen, um sie deutlich positiv ausfallen zu lassen. Man soll deshalb häufiges Filtrieren des Urins durch Filtrierpapier oder langes Stehenlassen desselben auf dem Papierfilter vermeiden und nötigenfalls Asbest oder Glaswolle dazu verwenden (Umber).

Die von Neumann¹⁾ angegebene Modifikation der Orcinprobe erscheint, auch nach Sachs²⁾, besonders zweckmäßig zur differentialdiagnostischen Unterscheidung der hier in Frage kommenden Kohlenhydrate. Ihre Vorschrift ist folgende:

10 Tropfen ($= \frac{1}{2} \text{ cm}^3$) der zu prüfenden wäßrigen Zuckerlösung werden in einem weiten Reagensglas mit 5 cm^3 käuflichem 99% igen Eisessig und einigen Tropfen einer starken (etwa 5% igen) alkoholischen Orcinlösung versetzt und dann nach dem Umschütteln bis zum völligen Sieden erhitzt. Man hält das Reagensglas mit einem Halter und läßt nun aus einer mit weitem Tropfrohr versehenen Tropfflasche konzentrierte Schwefelsäure hinzufließen, indem man anfangs 2mal nach je 5, dann nach je 10 Tropfen kräftig umschüttelt. Dieses tropfenweise Zugabe der Schwefelsäure unter Umschütteln ist notwendig, weil sonst die Flüssigkeit mit Sicherheit aus dem Reagensglas hinausgeschleudert wird. Man fügt so lange Schwefelsäure hinzu, bis nach dem Umschütteln ein recht deutlicher Farbton bestehen bleibt. Dieser Endpunkt richtet sich nach der Konzentration der zu prüfenden Zuckerlösung, ist aber auch bei sehr schwachen Lösungen durch 40–50 Tropfen zu erreichen. Mehr als 50 Tropfen zuzusetzen hat keinen Zweck, weil dann eine etwa auftretende gelbe Färbung durch Zersetzung des Orcins herbeigeführt wird. Umgekehrt ist aber auch nach Eintritt deutlicher Färbung der weitere

¹⁾ Neumann, Berl. klin. Wochenschr. 1904, S. 1073. — ²⁾ Sachs, Biochem. Zeitschr. 1907, Bd. 1, S. 383.

Zusatz von Schwefelsäure zu vermeiden, weil sonst einerseits Mischfarben entstehen oder die Farbstofflösung wegen zu starker Färbung nicht direkt mit dem Spektroskop untersucht werden kann. Man betrachtet die Lösung zur Feststellung des Farbentons und zur spektroskopischen Untersuchung erst nach einigen Minuten, wenn sie abgekühlt ist. Ist sie zu stark gefärbt, so kann man allemal mit Eisessig verdünnen, ohne daß sich die Farbe ändert. Zusatz von viel Alkohol oder Wasser kann erhebliche Veränderungen hervorrufen. Die stark mit Wasser versetzten Lösungen lassen sich zur Konzentrierung des Farbstoffs noch mit Amylalkohol ausschütteln.

Die Identifizierung der Pentose kann als Phenylsazon nach Neuberg¹⁾ geschehen.

Die Farbstofflösungen haben folgende Eigenschaften:

Zuckerart	Farbe	Absorptionsstreifen	Durch Alkohol oder Wasser zersetzlich?
a) Arabinose	violettrot	rechts von D, bedeckt gelb und gelbgrün	nein
b) Xylose	warm: violettblau kalt: blau	1. rechts von C im Orange, 2. wie bei a), jedoch schwächer. Beim Stehen nimmt 1 an Intensität zu, 2 ab	nein
c) Glykuronsäuren	warm: grün kalt: grünblau	links von C im Rot, das ganze Spektrum ist beschattet	durch Alkohol oder Wasser rötlich
d) Glykose	braunrot	rechts von b) im Grün, so daß vor dem Streifen noch Grün, hinter ihm Blau und Violett zu sehen sind	nein
e) Fruktose	warm: braun kalt: gelbbraun	1. links von C im Rot wie bei c). 2. Verdunkelung, beginnend wie bei d), bis zum Schluß des Spektrums	durch Alkohol oder Wasser gelbgrün

Im normalen Zustand zeigt der Harn eine geringe bräunlich-grünliche Färbung, die wahrscheinlich als Mischfarbe von den normalen Spuren Glykuronsäure und Glykose herrührt.

¹⁾ Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1900, Bd. 33, II, S. 2243.

4. Lävulose.

Nachweis mittelst der Seliwanoffschen Probe, die so angestellt wird, daß man einige Kubikzentimeter Harn mit der gleichen Menge 25%iger (offizineller) Salzsäure und einigen Körnchen Resorzin kurz aufkocht. Bei Anwesenheit von Lävulose tritt eine Rotfärbung auf, die bei stärkerem Lävulosegehalt schon beim Erwärmen des Harns mit eigentümlich bläulich-roten Schlieren beginnt. Beim Auftreten der Rotfärbung kühlt man unter der Wasserleitung, gießt die Flüssigkeit in eine Schale oder ein Becherglas, macht mit Soda alkalisch, gießt in das Reagensglas zurück und schüttelt nun, nicht mit Amylalkohol nach der von Rosin¹⁾ angegebenen Modifikation, sondern mit Essigäther (Borchardt²⁾) aus. Bei Anwesenheit von Lävulose färbt sich der Essigäther gelb.

Das Vorhandensein von Nitriten, die sich im Harn nach längerem Stehen bilden können, kann unter Umständen eine positive Seliwanoffsche Reaktion vortäuschen (R. u. O. Adler³⁾). Darum ist es zweckmäßig, frischen Harn mit dieser Probe zu prüfen. Auch Indikan kann eine positive Seliwanoffsche Reaktion vortäuschen. Die Nitrite können durch 1 Minute langes Kochen des mit Essigsäure angesäuerten Harnes entfernt werden. Borchardt empfiehlt in allen Fällen, in denen der Indikangehalt des Harnes groß ist, das Indikan vorher zu entfernen, indem man gleiche Teile Urin und Obermeyersches Reagens mit Chloroform mehrfach ausschüttelt. Da das Obermeyersche Reagens rauchende Salzsäure enthält, muß man nach Abgießen des Chloroforms erst mit $\frac{1}{3}$ Volumen Wasser verdünnen, damit die Salzsäurekonzentration zur weiteren Anstellung der Seliwanoffschen Reaktion die richtige wird; man fügt dann einige Körnchen Resorzin hinzu und verfährt in der angegebenen Weise. Der Nachweis der Lävulose soll hierdurch nicht gestört werden.

Auch ein Gehalt des Urins an Urorosein kann eine positive Seliwanoffsche Probe vortäuschen. Man erkennt es daran, daß die Rotfärbung des Harns schon in der Kälte auftritt. Man soll dann das Urorosein erst dadurch entfernen, daß man gleiche Teile Urin und 25% Salzsäure 2–3mal mit Amylalkohol ausschüttelt und dann nach Abtrennen des Amylalkohols im Scheidetrichter, die Seliwanoffsche Reaktion, wie oben angegeben, weiter durchführt (Borchardt). Ferner kann bei Dextroselösungen in einer Konzentration, die 2% überschreitet, bei gleichzeitiger zu starker HCl-Konzentration durch katalytische Um-

¹⁾ Rosin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1903, Bd. 38, S. 555; Salkowski-Festschrift 1904.

– ²⁾ Borchardt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1908, Bd. 55, S. 241. – ³⁾ R. u. O. Adler, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 69, Heft 3 u. 4; Biochem. Zeitschr. 1912, Bd. 38, S. 310.

wandlung von Dextrose in Lävulose eine positive Seliwanoffsche Reaktion entstehen (Königsfeld¹⁾).

Die Seliwanoffsche Reaktion ist sehr fein und zeigt im Urin noch einen Lävulosegehalt von 0.05 an.

Neuberg²⁾ hat zur Identifizierung der Lävulose die Darstellung des Fructose-Methylphenylosazons (vom Schmelzpunkt 158° und charakteristischem Verhalten im Pyridinalkohol) vorgeschlagen, das für Ketonzucker überhaupt charakteristisch ist, wenn bestimmte Kautelen eingehalten werden. Andere Ketonzucker als die Fructose sind aber im Harn bisher nicht bekannt. R. Ofner hält zwar diesen Nachweis nicht für eindeutig, indessen hat Neuberg³⁾ seine Einwände zurückgewiesen.

5. Maltose

verhält sich wie Traubenzucker, d. h. sie reduziert, ist gärbare und dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, u. zw. über doppelt so stark als Dextrose. Isomaltose hingegen ist nicht gärbare, reduziert und dreht nur etwas stärker nach rechts als der Traubenzucker. Beide sind durch den Schmelzpunkt und N-Gehalt ihres Osazons charakterisiert (s. u.).

6. Glykuronsäuren

können, wie schon mehrfach erwähnt, zur Verwechslung mit Zuckern Veranlassung geben. Sie sind in kleiner Menge in gepaarter Form im normalen Harn vorhanden und treten in größeren Quantitäten nach Einnahme einer großen Anzahl von Substanzen der aromatischen und fetten Reihe auf (Choralhydrat, Campher, Menthol, Terpentin, Carbonsäure u. s. w.). Die gepaarten Glykuronsäuren drehen nach links, die freien, die sich bei längerem Stehen des Harns entwickeln können, nach rechts, reduzieren stark und werden durch Hefe nicht vergoren; die gepaarten Glykuronsäuren reduzieren teilweise und sind nicht gärfähig. Der Nachweis geschieht durch die Orcinprobe (s. o. unter Pentosen) oder die Phloroglucinprobe, die in der gleichen Weise wie jene angestellt wird und eine kirschrote Farbe mit einem Absorptionsstreifen zwischen D und E ergibt. Mit salzsaurem p-Bromphenylhydrazin und Natriumacetat gibt Glykuronsäure eine in absolutem Alkohol völlig unlösliche, in einem Gemisch von 4 cm³ Pyridin und 6 cm³ Alkohol lösliche Verbindung, die sehr starke Linksdrehung zeigt (Neuberg).

¹⁾ Königsfeld, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 1902, Bd. 35, S. 959. — ²⁾ Neuberg, ebenda 1904, 37. Jahrg., Heft 17, S. 4616. — ³⁾ Neuberg, ebenda.

7. Osazone.

Von großer Bedeutung für die Identifizierung der verschiedenen im Harn vorkommenden Zuckerarten ist die Darstellung ihres Osazons, dessen Schmelzpunkt und N-Gehalt zu ihrer Charakterisierung dient. Die Osazone entstehen beim Kochen des zuckerhaltigen Urins (etwa 10 cm³) mit Phenylhydrazin und 50 % Essigsäure (je 5 Tropfen) im Wasserbad nach $\frac{1}{2}$ – 1 Stunde.

Über den verschiedenen N-Gehalt und Schmelzpunkt der Osazone sowie über die sonstigen für die im Harn vorkommenden Zuckerarten charakteristischen Eigenschaften unterrichtet zusammenfassend die folgende, dem Buche von Mohr-Beuttenmüller¹⁾ entnommene, etwas modifizierte Tabelle:

Zucker	Reduktion	Spec. Drehung	Gärung	Osazon		Spezielle Reaktionen
				Schmelzpunkt	N-Gehalt	
Dextrose	+	+ 52·49°	+	205°	ca. 15·7 %	Osazonnadeln in heißem Wasser unlöslich
Lävulose	+	– 92·25°	+	205°	ca. 15·7 %	Seliwanoffsche Reaktion, Darstellung des Methylphenylosazons
Maltose	+	+ 136·5°	+	206°	ca. 10 %	
Iso-maltose	+	+ 68·0°	–	153°	ca. 10 %	
Lactose	+	+ 52·53°	–	200°	ca. 10 %	Rubnersche Probe?
Pentose	+	0	–	unrein 157–160° rein 166–168°	ca. 17·0 %	Orcinprobe, Osazonnadeln in heißem Wasser löslich, in kaltem unlöslich
Gepaarte Glykuronsäure	teilweise +	verschieden stark links	–	200–205°	verschieden	
Freie Glykuronsäure	+	verschieden stark rechts	–	200–205°	verschieden	Orcin- und Phloroglucinprobe; Bromphenylhydrazinverbindung

¹⁾ Mohr u. Beuttenmüller, Methodik der Stoffwechseluntersuchungen. Wiesbaden 1911, I. F. Bergmann.

B. Acidosekörper.

Qualitativer Nachweis.

1. Aceton

wird nachgewiesen mit der Legalschen Probe:

Zu etwa 5 cm^3 Harn fügt man einige Tropfen einer frisch bereiteten etwa 5%igen Nitroprussidnatriumlösung und macht dann mit starker Natron- oder Kalilauge alkalisch. Bei Anwesenheit von Aceton (auch von reichlich Kreatinin) entsteht dann eine rubinrote Farbe (die langsam abbläßt, wenn sie von Kreatinin herrührt). Setzt man nun etwas Eisessig zu, so tritt bei Anwesenheit von Aceton eine purpurrote bis karminrote Färbung auf, die später über Violett in Blau übergeht, während bei Abwesenheit von Aceton sich die Lösung gelb färbt.

2. Acetessigsäure.

Zum Nachweis dient die Gerhardt'sche Eisenchloridprobe:

Zu einigen Kubikzentimetern Harn fügt man tropfenweise konzentrierte Eisenchloridlösung, bis der anfangs entstehende Niederschlag von Ferriphosphat sich wieder auflöst. Je nach der Menge der vorhandenen Acetessigsäure färbt sich die Lösung bordeauxrot (+), dunkelrotviolett (++) oder schwarz (+++). Eine positive Acetessigsäurereaktion kann vorgetäuscht werden durch Ameisensäure, Essigsäure und Rhodanwasserstoffsäure, ferner durch Phenole und Phenolcarbonsäuren. Um zu entscheiden, ob es sich um Acetessigsäure oder eine dieser Substanzen handelt, wird der Harn vor Anstellen der Reaktion kurz aufgeköcht: handelt es sich um Acetessigsäure, so tritt die Reaktion jetzt nicht mehr auf. Um die Acetessigsäure neben den genannten Säuren nachzuweisen, prüft man den ätherischen Auszug des angesäuerten Harns mit einer dünnen wäßrigen Eisenchloridlösung. Hierbei tritt keine Färbung auf, wenn die Reaktion auf der Gegenwart von Ameisensäure oder Essigsäure beruhte. Bei Gegenwart von Rhodanwasserstoffsäure wird die ätherische, bei Vorhandensein von Acetessigsäure die wäßrige Schicht rot.

Nach Genuß von salicylsäurehaltigen Mitteln, Phenazetin, Antipyrin, Thallin u. a. ist die Reaktion nicht brauchbar.

3. β -Oxybuttersäure

wird gewöhnlich nachgewiesen durch Überführung in α -Krotonsäure, indem der eventuell eingeengte Harn mit dem gleichen Volumen

konzentrierter Schwefelsäure destilliert wird. Es ist dabei nach Embden u. Schmitz¹⁾ zweckmäßig, das Volumen des Harnschwefelsäuregemisches durch Zutropfenlassen von Wasser aus einem Tropftrichter einigermaßen konstant zu erhalten. Aus den ersten Teilen des Destillates scheidet sich bei genügender Abkühlung (Auffangen in eisgekühltem Kolben) unter Umständen direkt die sehr charakteristisch riechende α -Krotonsäure ab. Stets ist sie leicht zur Krystallisation zu bringen, wenn man das gewonnene Destillat mehrmals ausäthert und den Äther spontan verdunsten läßt. Der Schmelzpunkt der Krystalle liegt bei 71–72°. Die Reinigung der eventuell durch flüchtige Fettsäuren verunreinigten Krystalle geschieht nach Embden u. Schmitz am besten durch Lösen in Äther, Verjagen des größten Teils des Äthers durch Erwärmen und Fällung mit Petroläther. Der Schmelzpunkt der bei der Destillation ebenfalls leicht mit den Wasserdämpfen übergehenden, aus Hippursäure frei gewordenen Benzoesäure liegt bei 121°.

Quantitative Bestimmung.

a) Polarimetrische Bestimmung der β -Oxybuttersäure.

Prinzip: Die β -Oxybuttersäure wird mit Äther im Lindschen Apparat extrahiert und die Linksdrehung des Auszuges polarimetrisch bestimmt.

Ausführung nach Embden u. Schmitz²⁾:

Je nach dem Gehalt an β -Oxybuttersäure werden 100–300 cm^3 Harn mit Ammonsulfat gesättigt, wozu auf je 100 cm^3 Harn 90 g Ammonsulfat in Anwendung kommen, mit 25 % Schwefelsäure stark angesäuert und im Lindschen Apparat (s. u.) 6–8 Stunden mit Äther extrahiert. Der gewonnene Ätherextrakt wird unter öfterem Nachspülen mit Äther in einen Destillationskolben quantitativ filtriert, mit 5 cm^3 Wasser versetzt und unter sorgfältiger Vermeidung stärkerer Erwärmung der Äther abdestilliert. Der wäßrige Rückstand wird sofort unter der Wasserleitung abgekühlt, in einem Meßcylinder unter quantitativem Nachspülen auf 10–15 cm^3 gebracht, mit ganz wenig Tierkohle in der Kälte geschüttelt, in ein Polarisationsrohr filtriert und polarimetrisch untersucht. Die abgelesene Linksdrehung soll möglichst einer Traubenzuckermenge von mindestens 2 % entsprechen.

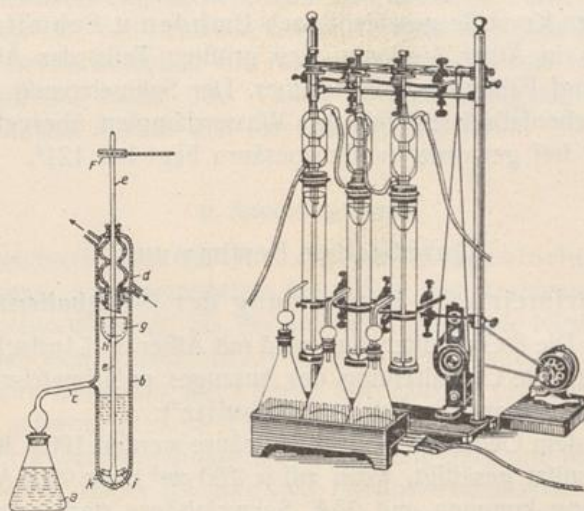
Durch Multiplikation der gefundenen (für Traubenzucker gelten den) Prozentzahl mit 2,18 erhält man den prozentualen β -Oxybutter-säuregehalt.

¹⁾ Embden u. Schmitz, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. IV, Teil 5, Heft 2, 1924, Urban & Schwarzenberg. — ²⁾ Embden u. Schmitz, ebenda.

Beschreibung des Lindschen Extraktionsapparates:

Der Apparat (s. Abb. 49) besteht aus einem Erlenmeyer-Kolben *a*, in dem der Äther verdampft. Der Dampf gelangt durch eine Röhre *c* in das Extraktionsgefäß *b*, wird in dem Kühler *d* kondensiert und tropft in die Auffangsschale *g*. Von hier gelangt er durch eine Bohrung *h* in die Röhre *e*, die in der Nähe ihres unteren Endes zwei mit ihr kommunizierende hohle Rührarme *i* trägt, die mit kleinen Austrittsöffnungen *k* versehen sind. Durch diese Austrittsöffnungen tritt der Äther, der aus

Abb. 49.



der Auffangsschale in die Röhre *e* gelangt, in den zu extrahierenden Harn, passiert alsdann die Harnschicht und fließt dauernd durch die Röhre *c* in den Extraktionskolben zurück. Die Röhre *e* ist oberhalb des Kühlers mit einer Antriebsscheibe *F* versehen, vermittelt derer sie unter Anwendung eines Elektromotors und eines passenden Vorgeleges in dauernde rasche Rotation versetzt wird. Der aus den Enden der Rohrarme austretende Äther wird dadurch außerordentlich fein verteilt, so daß er in sehr kleinen, bei genügender Rotation fast staubförmigen Tröpfchen die Flüssigkeit durchdringt.

Außer der β -Oxybuttersäure gehen nach Embden u. Schmitz noch andere linksdrehende Substanzen in den Ätherextrakt über. Deswegen ist die polarimetrische Bestimmung der β -Oxybuttersäure nur bei Vorhandensein größerer Mengen dieser Substanz im Harn anwendbar. Die Methode liefert stets etwas zu hohe Mengen, jedoch beträgt der

Fehler bei β -Oxybuttersäuremengen von über 10 g in der Tagesmenge weniger als 10%.

Die Methode hat sich uns für klinische Zwecke als einfachste, schnellste und genaueste außerordentlich gut bewährt und wurde früher jahrelang als Methode der Wahl angewandt. In den letzten Jahren konnte sie nicht mehr allgemein benutzt werden, weil sie wegen der großen erforderlichen Äthermengen sehr teuer ist. Wir sind deswegen dazu übergegangen, die Ätherextraktion zu umgehen und einfach die Linksdrehung des 24 Stunden mit Hefe vergorenen Harnes zu bestimmen. Unbedingtes Erfordernis für diese direkte Bestimmung der Linksdrehung des vergorenen Harnes ist aber die Benutzung eines sehr empfindlichen Polarisationsapparates (Landolt-Lippichscher Dreischattenapparat). Bei Verwendung dieses Apparates aber ergibt die direkte Polarisationsmethode für klinische Zwecke ausreichend genaue Resultate, wie uns zahlreiche Kontrollversuche mit andern Methoden gezeigt haben. Als Belege hierfür geben wir einige beliebig herausgegriffene Kontrollanalysen von polarimetrischer Bestimmung und Untersuchung mittels der Methoden von Lublin und von van Slyke:

Willi Len., 22jähriger Diabetes gravis:

T a g	β -Oxybuttersäure, bestimmt durch Polarisation des vergorenen Harns	Bestimmung nach Lublin	
		Gesamtaceton	β -Oxybuttersäure
9. November 1924	 29.3 g	4.5 g	25.4 g
10. " 1924	 29.7 "	4.9 "	25.5 "
11. " 1924	 15.8 "	2.6 "	12.5 "
12. " 1924	 12.7 "	1.95 "	10.1 "
13. " 1924	 10.2 "	2.2 "	9.9 "

Marta Coh., 55jährige schwere Diabetica:

T a g	β -Oxybuttersäure, bestimmt durch Polarisation des vergorenen Harns	Bestimmung nach Lublin	
		Gesamtaceton	β -Oxybuttersäure
2. November 1924	 22.5 g	5.39 g	16.4 g
3. " 1924	 11.88 "	2.78 "	8.46 "
4. " 1924	 42.9 "	8.9 "	33.7 "
5. " 1924	 4.2 "	2.9 "	5.4 "

Frau Dibb, 26jährige mittelschwere Diabetica:

T a g	β -Oxybuttersäure, bestimmt durch Polarisation des vergorenen Harns	Bestimmung nach van Slyke	
		Gesamtaceton	β -Oxybuttersäure
23. November 1924	 9.5 g	2.83 g	10.55 g
24. " 1924	 6.6 "	0.89 "	3.7 "
25. " 1924	 1.5 "	0.18 "	0.86 "
26. " 1924	 2.2 "	0.26 "	1.5 "

Frau Jon., 50jährige mittelschwere Diabetica:

T a g		β -Oxybuttersäure, bestimmt durch Polarisation des vergorenen Harns	Bestimmung nach van Slyke	
			Gesamtaceton	β -Oxybuttersäure
27. November	1924	 9.9 g	2.0 g	8.5 g
28. "	1924	 11.4 "	1.99 "	9.87 "
29. "	1924	 4.3 "	0.9 "	3.1 "
30. "	1924	 2.1 "	0.6 "	2.1 "
1. Dezember	1924	 3.5 "	0.9 "	3.7 "
2. "	1924	 3.3 "	0.8 "	2.5 "

Es ergibt sich aus diesen Beispielen sowie aus unserm sonstigen großen Analysenmaterial, daß die Linksdrehung des vergorenen Harns immer etwas größere Mengen β -Oxybuttersäure anzeigt, als die durch die Lublinsche und van Slykesche Methode gefundenen. Dabei entsprechen aber ziemlich genau die nach den letzten beiden gefundenen Gesamtacetonkörperwerte (β -Oxybuttersäure + Acetessigsäure + Aceton) den direkt polarimetrisch gewonnenen β -Oxybuttersäuremengen. Es unterrichtet uns also diese äußerst einfache, wenige Minuten Arbeit beanspruchende und billige Methode bei Benutzung eines Landolt-Lippichschen Dreischattenapparates für rein klinische Zwecke mit genügender Genauigkeit über die Stärke der Gesamtaacidose. Für getrennte Bestimmung der 3 Acetonkörper, sowie für wissenschaftliche Zwecke genügt sie natürlich nicht, sondern muß durch die polarimetrische Untersuchung des Ätherextraktes oder durch eine der im folgenden besprochenen Methoden ersetzt werden.

b) Bestimmung des **Gesamtacetons** (Aceton + Acetessigsäure) als Aceton nach Messinger-Huppert, modifiziert nach Embden-Schmitz¹⁾:

Prinzip: Aceton und in Aceton übergeführte Acetessigsäure bildet mit Jodlösung und Alkali Jodoform und Essigsäure. Nach Abscheidung des Jodoforms wird das überschüssige Jod in Freiheit gesetzt und mit Natriumthiosulfat zurücktitriert.

Erforderliche Reagenzien:

1. 50 % ige Essigsäure.
2. 33 % ige Natronlauge.
3. Salzsäure.
4. n/10 Jodlösung.
5. n/10 Thiosulfatlösung.
6. 1 % ige Stärkelösung.

¹⁾ Embden-Schmitz, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 5, Heft 2.

Der Titer der Natriumthiosulfatlösung (am besten mit Kaliumbichromatlösung bestimmt, s. u. II, B., 2.) und der Jodlösung muß häufig kontrolliert werden. Diese Lösungen müssen kühl und dunkel aufbewahrt werden. Die Natronlauge muß nitritfrei sein und vor dem Gebrauch auf ihr Verhalten gegen Jod geprüft werden, von dem die Handelsware manchmal kleine Mengen bindet. Ebenso kann die Anwesenheit von kleinen Eisenmengen in der benutzten Salzsäure zu Jodverlusten führen.

Ausführung: In einen Erlenmeyer-Kolben von 750 cm^3 mißt man 150 cm^3 Wasser, 2 cm^3 50% iger Essigsäure und den zu untersuchenden Harn (bei reichlichem Acetongehalt 20 cm^3 , bei geringerem entsprechend mehr). Als Vorlage bei der mit diesem Gemisch vorzunehmenden Destillation benutzt man einen Erlenmeyer-Kolben von 750 cm^3 , der mit 150 cm^3 möglichst kalten Wassers beschickt ist, so daß das Destillationsrohr in dasselbe eintaucht. Unter ausgiebiger Kühlung wird nunmehr destilliert und während 20–25 Minuten im Sieden erhalten, wobei etwa 60 cm^3 Flüssigkeit übergehen sollen. Nachdem dann die Destillation unter Abspülen des Destillationsrohres unterbrochen ist, wird sofort die Titration vorgenommen. Zu diesem Zweck werden in die Vorlage 30 cm^3 33% ige Natronlauge und aus einer Bürette unter leichtem Umschwenken ein reichlicher Überschuß von Jod gegeben. Man erkennt das Vorhandensein überschüssigen Jods daran, daß 1 Tropfen Salzsäure an der Einfallsstelle eine braune Färbung hervorruft. Das Jodoform fällt zunächst als weißliche Trübung aus, die sich bald in intensiv gelb gefärbte Krystalle umwandelt. Nach 5 Minuten säuert man mit einem Überschuß von Salzsäure an (d. h. nach Auftreten der braunen Jodfarbe setzt man noch etwa 2 cm^3 Salzsäure zu) und titriert nach Zusatz von Stärkelösung das unverbrauchte Jod mit n/10 Thiosulfatlösung zurück.

Berechnung: 1 cm^3 verbrauchter Jodlösung entspricht 0.967 mg Aceton.

c) Colorimetrische Bestimmung des **Acetons** nach Adler¹⁾:

Prinzip: Die nur annähernde, aber für klinische Zwecke allenfalls ausreichende Resultate gebende Methode vergleicht colorimetrisch die bei der Legalschen Probe erhaltene Farbenintensität mit bestimmten empirisch zusammengesetzten Farbstoffen.

Herstellung der Vergleichslösungen:

1. Neutralrot 1:1000.
2. Neublau 1:1000.
3. Diamantphosphin 1:100 (Farbstoffe von Leopold Cassella, Frankfurt a. M.).

¹⁾ Adler, Münch. med. Wochenschr. 1919, 722.

Gemische dieser 3 Lösungen in bestimmten Mengenverhältnissen zeigen die gleichen Farbnuancen, wie sie acetonhaltige Harne bei der Legalschen Probe ergeben. Aus diesen Farbstofflösungen sind herzustellen folgende Testlösungen:

- I. 10 cm^3 Neutralrot (1)
 3 " Neublau (2)
 0.6 " Diamantphosphin (3)
 5 " Aq. dest.
 Diese Mischung entspricht 0.1 % Aceton.
- II. 10 cm^3 Testlösung I.
 10 " Aq. dest.
 Diese Mischung entspricht 0.08 % Aceton.
- III. 5 cm^3 Testlösung I.
 10 " Aq. dest.
 Diese Mischung entspricht 0.05 % Aceton.
- IV. 5 cm^3 Testlösung I.
 15 " Aq. dest.
 Diese Mischung entspricht 0.01 % Aceton.
- V. 5 cm^3 einer Mischung von 10 cm^3 Neutralrot (1)
 1 " Neublau (2)
 0.1 " Diamantphosphin (3)
 50 cm^3 Aq. dest.
 Diese Mischung entspricht 0.005 % Aceton.

Je 13 cm^3 der 5 Testlösungen werden in gleich weite Reagenströhrchen eingeschmolzen, die auf ein Gestell mit weißem Grunde schräg zu stehen kommen, mit Zwischenräumen für den zu untersuchenden Harn¹⁾.

Sonstige erforderliche Reagenzien:

4. 20 % ige Natronlauge.
5. 33 % ige Nitroprussidnatriumlösung.
6. Eisessig.

Ausführung: In ein Reagensglas von gleichem Kaliber wie das der Vergleichslösungen werden gefüllt 10 cm^3 Urin, 1 cm^3 20 % ige Natronlauge, 0.5 cm^3 33 % ige Natriumnitroprussidlösung und 20 Tropfen Eisessig, tropfenweise unter Umschütteln. Dann wird sofort durch Einsetzen des Reagensglases in das Gestell die Farbe des Harns mit der der Farbblösungen verglichen. Bei Farbgleichheit mit Testlösung I ist der

¹⁾ Das Gestell mit den fertigen Farbröhrchen kann bezogen werden von L. Dröll, Frankfurt a. M.

Urin mit dem gleichen Volumen normalen Urins zu verdünnen und die Prüfung zu wiederholen.

Die Adlersche Methode hat sich uns wenig bewährt aus folgenden Gründen:

1. Die Farbintensität der Legalschen Probe läßt sehr schnell nach, u. zw. mit verschiedener Geschwindigkeit.
2. Farbenintensität und Acetongehalt scheinen nicht völlig proportional zu sein, wie auch mehrfach in der Literatur angegeben.
3. Die Werte nach Adler weichen beträchtlich ab von dem nach Lublin bestimmten Gehalt an Aceton und Acetessigsäure.
4. Der nach Lublin bestimmten Gesamtacidose kommen die Adlerschen Werte z. T. näher, doch fallen dazwischen weite Abweichungen (wie nach Punkt 1 und 2 nicht anders zu erwarten).
5. In den Werten der Farbskala von 0·1 — 0·005 % ist eine leidlich genaue Ablesung möglich. Bei allen Fällen mit mehr als 0·1 % ist kaum mehr als eine Schätzung, ob Zu- oder Abnahme der Acidose, möglich.
6. Von der Linksdrehung nach Vergärung weichen die Adlerschen Werte weit ab.

d) Bestimmung der **Gesamtacetonkörper** nach van Slyke¹⁾, modifiziert nach W. Lintzel²⁾.

Prinzip: Aceton bildet beim Kochen mit Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung einen schwer löslichen Niederschlag, der neben Aceton basisches Quecksilbersulfat enthält. Der Niederschlag wird entweder getrocknet und gewogen, oder in verdünnter Salzsäure gelöst und auf seinen Quecksilbergehalt titriert. Da Traubenzucker bei der Oxydation Stoffe liefert, die mit Quecksilbersulfat ausfallen, wird er vor Anstellung der Bestimmung durch eine Kupfersulfatcalciumoxydfällung entfernt.

Erforderliche Reagenzien:

1. 20 % ige Kupfersulfatlösung.
2. 10 % ige Quecksilbersulfatlösung. 106·6 cm³ Schwefelsäure (spec. Gew. 1·84) mit Wasser auf 1 l gebracht, dazu 73 g rotes Quecksilberoxyd.
3. 50 Volumprozent Schwefelsäure.
4. 10 % ige Calciumhydroxydaufschwemmung. 100 g Ca(OH)₂ (Mercks reine Reagenzien) in 1 l Wasser.
5. 5 % ige Kaliumbichromatlösung.
6. 0·2 Mol. Kaliumjodidlösung. 33·204 g JK auf 1 l gebracht.
7. 0·05 Mol. Quecksilberchloridlösung. 13·575 g HgCl₂ auf 1 l gebracht.

¹⁾ van Slyke, Journ. of. biol. Chem. 1917, Bd. 32. — ²⁾ W. Lintzel, Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 34, S. 1249.

Statt 2. und 3. kann zur Gesamtacetonkörperbestimmung eine fertige Lösung hergestellt werden: 219 g Quecksilberoxyd, 755 cm³ reine Schwefelsäure, Wasser zum Gesamtvolumen von 12·5 l (van Slykes kombiniertes Reagens).

Der Titer der Sublimatlösung, gegen die die Jodidlösung eingestellt wird, wird durch Bestimmung des Quecksilbers als Sulfid festgestellt. 25 cm³ der Lösung, mit 100 cm³ Wasser verdünnt und mit Schwefelwasserstoff gefällt, sollen 0·2908 g Niederschlag ergeben.

Vor Anstellung der Bestimmung ist die Entfernung des Zuckers erforderlich. Zu diesem Zweck werden in einem 250 cm³ Meßkolben 25 cm³ Urin, 10 cm³ Wasser, je 50 cm³ Kupfersulfatlösung und Calciumhydroxydlösung gegeben und geschüttelt. Wenn die Reaktion gegen Lackmus alkalisch ist — falls nicht, weiterer Zusatz von Calciumhydroxyd — wird bis zur Marke aufgefüllt und nach 1/2 Stunde durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Soll nur eine der folgenden Bestimmungen ausgeführt werden, genügt ein 100 cm³ Meßkolben mit 10 cm³ Urin und je 20 cm³ Kupfersulfat und Calciumhydroxyd.

α) Gleichzeitige Bestimmung der **Gesamtacetonkörper**. In einem 1/2 l Erlenmeyer-Kolben werden 25 cm³ Urinfiltrat, 100 cm³ Wasser, 10 cm³ 50 Volumenprozentige Schwefelsäure und 35 cm³ Quecksilbersulfatlösung (oder 25 cm³ Urinfiltrat und 145 cm³ kombiniertes van Slykesches Reagens) abgemessen. Unter dem Rückflußkühler wird bis zum Sieden erhitzt und beim Beginn des Kochens durch das Kühlrohr 5 cm³ Bichromatlösung zugesetzt. Es wird 1 1/2 Stunden gekocht, nach dem Abkühlen zur gewichtsanalytischen Bestimmung der Niederschlag auf einem gewichtskonstanten Gooch-Tiegel gesammelt, mit kaltem Wasser (200 cm³) gewaschen und im Trockenschrank getrocknet und gewogen. Bei 100° ist Gewichtskonstanz in 1 Stunde, bei 70° in 3–4 Stunden erreicht. Der Gooch-Tiegel kann ohne Reinigung immer wieder benutzt werden. — Zur Titrationsbestimmung wird der Niederschlag auf einer kleinen Trichternutsche gesammelt, gewaschen und mitsamt dem Filterblatt mit wenig Wasser in ein Becherglas gespült. Es wird mit 15 cm³ n/1 Salzsäure gelöst und mit Calciumacetatlösung abgestumpft. Aus einer Bürette wird soviel Kaliumjodidlösung zugesetzt, daß der auftretende rote Niederschlag wieder verschwindet. Der Überschuß von Jodid wird mit Quecksilberchloridlösung zurücktitriert, bis der erste bleibende rote Niederschlag auftritt.

β) Bestimmung von **Aceton** und **Acetessigsäure**. Es wird ebenso wie unter α) verfahren, jedoch kein Chromat zugesetzt und nur 45 Minuten unter Rückflußkühler gekocht.

γ) Bestimmung von **β-Oxybuttersäure**. 25 cm³ Urinfiltrat, 100 cm³ Wasser und 2 cm³ Schwefelsäure werden in einem offenen 1/2 l-Kolben

10 Minuten gekocht, im Meßcylinder gemessen und wieder in den Kolben gebracht. Der Meßcylinder wird mit der fehlenden Menge Wasser nachgespült und das ursprüngliche Volumen (127 cm^3) wieder hergestellt. Nach Zusatz von 8 cm^3 Schwefelsäure und 35 cm^3 Quecksilbersulfatlösung wird unter dem Rückflußkühler zum Sieden erhitzt, 5 cm^3 Bichromatlösung zugegeben und anderthalb Stunden gekocht. Der Niederschlag wird, wie unter a) angegeben, behandelt.

Die Berechnung geschieht nach folgenden Faktoren:

Ausgeführte Bestimmung	Als Aceton berechnet entsprechen		Als β -Oxybuttersäure berechnet entsprechen	
	1 g Niederschlag	1 cm^3 JK	1 g Niederschlag	1 cm^3 JK
Gesamtacetonkörper	2.48 %	0.0332 %	4.447 %	0.0595 %
β -Oxybuttersäure	2.64 %	0.0344 %	4.734 %	0.0617 %
Aceton + Acetessigsäure	2.00 %	0.0260 %	3.586 %	0.0466 %

Die titrimetrische oder gewichtsanalytische Methode können wahlweise angewandt werden. Doch geben van Slyke sowohl als Lintzel an, daß die Titration von Niederschlägen unter 50 mg sehr schwierig und unsicher ist. Bei größeren Niederschlägen hingegen empfiehlt sich die titrimetrische Methode, wobei das Trocknen im Gooch-Tiegel fortfällt.

e) Mikromethode zur Bestimmung des Acetons und der β -Oxybuttersäure nach Lublin¹⁾.

Prinzip: Das präformierte und das beim Kochen aus Acetessigsäure gebildete Aceton wird in eine Jodlösung überdestilliert und zu Jodoform umgesetzt; die überschüssige Jodmenge wird durch Titration mit Natriumthiosulfat bestimmt. Die β -Oxybuttersäure wird durch Kochen mit Bichromatschwefelsäure ebenfalls in Aceton umgewandelt und dann in derselben Weise bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. 2 % ige Lösung von Kaliumbichromat in 20 % iger Schwefelsäure.
2. 10 % ige Essigsäure.
3. 25 % ige Natronlauge.
4. n/100 Jodlösung.
5. n/100 Natriumthiosulfatlösung.
6. 1 % ige Stärkelösung.

Ausführung: Mit einer Stangenpipette von 1 cm^3 Inhalt wird 0.5 cm^3 Harn (bei starkem Ausfall der qualitativen Probe $0.4\text{--}0.25\text{ cm}^3$) in einen Mikrokjeldahl-Kolben von 50 cm^3 Inhalt überführt und dazu

¹⁾ Lublin, Bioch. Zeitschr. 1922, Bd. 133. — Klin. Wochenschr., 1. Jahrg., Nr. 15, 35 u. 46.

25 cm^3 Wasser + 1 cm^3 10% ige Essigsäure (zur Bindung der Phenole) und eine Spur Talkum gegeben. Alsdann wird der Kolben an das Destillationsrohr eines Mikrokjeldahl-Apparates nach Bang¹⁾ gesetzt und sein Inhalt mit sehr niedrigem, gegen Luftzug geschütztem Bunsenbrenner 10 Minuten in eine Vorlage A destilliert, die aus 40 cm^3 Wasser, 10 cm^3 n/100 Jodlösung und 5 cm^3 25% iger Natronlauge in einem Erlenmeyer-Kolben von 200 cm^3 Inhalt besteht. Nach 10 Minuten ersetzt man bei unverändert weitergehender Destillation die Vorlage A durch eine Vorlage B, die aus 40 cm^3 Wasser und 15 cm^3 n/100 Jodlösung (da der

β -Oxybuttersäuregehalt gewöhnlich das 4–7fache des Acetongehaltes beträgt) und 5 cm^3 25% ige Natronlauge in einem Erlenmeyer-Kolben von 200 cm^3 Inhalt besteht, und läßt aus einem kleinen Scheidetrichter unter Vermeidung von Acetonverlust langsam 20 cm^3 Kaliumbichromatschwefelsäure (2 g Kaliumbichromat, 80 cm^3 Wasser, 20 cm^3 100 volumenprozentige Schwefelsäure) in den Kjeldahl-Kolben tropfen. Nach weiteren 10 Minuten wird diese zweite Destillation unterbrochen.

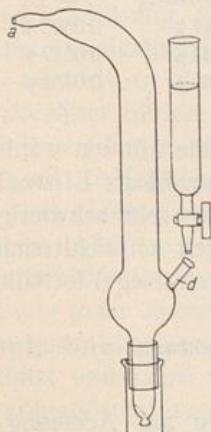
Die Kaliumbichromatschwefelsäure muß gleichmäßig tropfen, etwa 1 Tropfen pro Sekunde. Um ein zu schnelles Tropfen und Stagnation der Tropfen im Destillationsrohr, die ein Herübersaugen des Vorlageinhaltes in den Destillierkolben zur Folge haben kann, zu vermeiden,

empfiehlt es sich, den unteren Teil des Destillationsrohres etwa 1 cm^3 im lichten Durchmesser weit anfertigen, schräg abschneiden (mit dem längeren Ende nach der Seite der Chromatzuführung), unten im ganzen etwas centralaufwärts biegen und in ein Knöpfchen auslaufen zu lassen. Der in den Kjeldahl-Kolben hineinragende Teil des Destillationsrohres soll so weit sein, daß er, mit einem Stück Gummischlauch überzogen, fest in den Hals des Kjeldahl-Kolbens hineingesteckt werden kann. Obenstehende Abb. 50 zeigt den Destillationsaufsatz, dessen oberes Ende a durch ein Stück Paragummi mit dem wassergekühlten Destillationsrohr, und dessen seitliches Ende d ebenfalls durch ein Stück Paragummischlauch mit dem Scheidetrichter zu verbinden sind.

Jede der beiden Vorlagen wird unmittelbar nach beendeter Destilla-

¹⁾ Bang, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. Wiesbaden 1916, Bergmann.

Abb. 50.



tion titriert. Dazu säuert man mit 5 cm³ 25 % iger Schwefelsäure an und gibt 3 Tropfen einer 1 % igen Stärkelösung hinzu. Darauf wird mit einer n/100 Thiosulfatlösung aus einer Bangschen Mikrobürette aus Blau nach Farblos titriert. Sollte wegen sehr starker Acetonurie zu wenig Jod vorgelegt sein, was man daran erkennt, daß nach Schwefelsäure-zusatz keine Gelb- oder Braunfärbung auftritt, so kann die Analyse wiederum dadurch gerettet werden, daß man die Vorlage abermals durch 5 cm³ 25 % iger Natronlauge alkalisch macht, sie nach Zufügung neuer Jodlösung 5 Minuten stehen läßt und dann wieder mit 5 cm³ 25 % iger Schwefelsäure ansäuert. Empfehlenswerter ist aber, die Bestimmung mit einer entsprechend kleineren Harnmenge zu wiederholen.

Blindbestimmungen mit 25 cm³ Wasser, 1 cm³ 10 % iger Essigsäure und Talkum müssen von Zeit zu Zeit angestellt werden.

Berechnung: Die Anzahl der bei der Vorlage A verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung wird von der bei der Blindbestimmung ermittelten abgezogen und ergibt so den Jodverbrauch; dieser multipliziert mit 9.67 und dividiert durch die Anzahl der verwandten Kubikzentimeter Urin ergibt die Acetonmenge in Milligrammprozenten. Die bei der Vorlage B verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung werden ebenfalls von den bei dem entsprechenden Blindversuch verbrauchten abgezogen, mit 25 multipliziert und durch die Anzahl der benutzten Kubikzentimeter Harn dividiert; so erhält man die vorhandene β -Oxybuttersäure in Milligrammprozenten.

An Stelle der ziemlich kostspieligen Bang-Apparatur kann man sich eines 100-cm³-Kjeldahl-Kolbens und eines rechtwinklig gebogenen Glasrohres bedienen, dessen beide Schenkel je 5 cm lang sind. Der eine Schenkel wird durch die eine Öffnung eines doppelt durchbohrten Stopfens in den Hals des Kjeldahl-Kolbens geführt, während der andere Schenkel durch ein Stückchen Gummischlauch mit dem wassergekühlten Destillationsrohr verbunden wird. Durch die zweite Öffnung des Stopfens wird ein möglichst kurzes, S-förmig gekrümmtes Glasrohr eingeführt, das durch ein Stückchen Gummischlauch mit einem Scheidetrichter verbunden wird. Der wassergekühlte Teil des Destillationsrohres und der Mantel der Kühlung brauchen nicht aus Metall zu bestehen, sondern können aus Glas gefertigt sein.

Der Hauptvorteil dieser Lublinschen Methode besteht darin, daß sie für klinische Zwecke bei ausreichender Genauigkeit nur 20 Minuten Arbeitszeit erfordert.

C. Bestimmung der Gesamtsäure nach Moritz.

10 cm^3 Harn werden zur Ausfällung des Kalks mit einer Messerspitze reinen Kaliumoxalats (puriss. Kahlbaum) versetzt, nach einigen Minuten einige Tropfen Phenolphthalein hinzugefügt und mit $n/10$ Natronlauge bis zur dauernden Rotfärbung titriert. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Natronlauge multipliziert mit $\frac{1}{100}$ der Tagesharnmenge ergibt die Gesamtsäure, die bei gleichbleibender Kost ein gutes Urteil über die Harnacidose gestattet.

D. Ammoniakbestimmung nach Ronchèse-Malfatti.

Prinzip: Die Methode beruht auf der Tatsache, daß bei Einwirkung von Formalin auf Ammoniaksalze des Urins saure Verbindungen entstehen, die durch einfache Acidimetrie bestimmt werden können. Das zu verwendende Formalin wird wegen seines Gehaltes an Ameisensäure mit Phenolphthalein als Indikator durch $n/10$ Natronlauge bis zur eben beginnenden Rotfärbung neutralisiert.

Ausführung: 25 cm^3 Harn werden durch $n/10$ Natronlauge mit Phenolphthalein als Indikator neutralisiert, darauf 10 cm^3 neutralisiertes Formalin zugesetzt, worauf die rote Farbe wieder verschwindet. Nunmehr wird erneut $n/10$ Natronlauge bis zur abermaligen Rotfärbung zugesetzt. Jeder Kubikzentimeter der bei der zweiten Neutralisierung verbrauchten Natronlauge entspricht 1.7 mg Ammoniak. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Natronlauge multipliziert mit 0.0017 und dem 10. Teil der Tagesharnmenge ergibt also das darin enthaltene Ammoniak in Grammen.

Diese Ammoniakbestimmung kann unmittelbar an die Bestimmung der Gesamtsäure angeschlossen werden.

E. Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl¹⁾.

Prinzip: Der gesamte im Urin enthaltene Stickstoff wird durch Kochen mit konzentrierter Schwefelsäure in Ammonsulfat überführt, das Ammoniak durch Erhitzen mit starker Lauge entfernt und in Schwefelsäure von bestimmtem Gehalt aufgefangen; der übrig bleibende Rest der Säure wird durch Titration mit Lauge ermittelt. Aus der so festgestellten Ammoniakmenge wird der Stickstoff errechnet.

¹⁾ Kjeldahl, Zeitschr. f. anal. Chemie 1883, Bd. 22, S. 366—382.

Erforderliche Reagenzien:

1. Kjeldahl-Schwefelsäure (2 Gewichtsteile reiner Schwefelsäure und 1 Gewichtsteil rauchender N-freier Schwefelsäure werden gemischt).
2. 33 $\frac{1}{3}$ % ige stickstofffreie Natronlauge.
3. Talkum venetum.
4. Kupfersulfat.
5. n/10 Schwefelsäure.
6. n/10 Natronlauge.
7. 1% ige wässrige Methylorangelösung.

Ausführung:

a) Oxydation: 5 cm³ (eventuell enteweißten) Urins werden in einen Kjeldahl-Kolben gebracht, dazu läßt man langsam 10 cm³ Kjeldahl-Schwefelsäure aus einer Pipette fließen, worauf sich die ganze Masse nach kurzer Zeit braun färbt. Nun fügt man zur Beschleunigung der Oxydation eine kleine Messerspitze pulverisiertes Kupfersulfat zu und setzt den Kolben auf den im Abzug aufgestellten Verbrennungsapparat. Es wird zunächst, besonders bei Urinen, die reich an organischen Substanzen sind, mit kleiner Flamme erhitzt, dann mit voller Flamme so lange, bis die Flüssigkeit völlig farblos, bzw. schwach hellgrün, geworden ist, was $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden in Anspruch nimmt.

Abb. 51.



b) Destillation: Man läßt je nach der zu erwartenden N-Menge aus der Bürette 30 cm³ oder mehr n/10 Schwefelsäure in einen als Vorlage dienenden Erlenmeyer-Kolben laufen, verdünnt mit etwas Wasser, so daß das Destillationsrohr 1–2 cm eintaucht, und setzt einige Tropfen Methylorangelösung hinzu. Jetzt füllt man zu der erkalteten Lösung im Kjeldahl-Kolben reichlich Wasser, etwa bis zu $\frac{1}{3}$ seines Gehaltes, und zur Vermeidung des Stoßens einen Teelöffel Talkum. Dann setzt man den Kolben auf den Destillationsapparat, stülpt den Gummistopfen halb darüber, läßt schnell, aber vorsichtig, zur Vermeidung von Ammoniakverlusten, vom Rande aus 50 cm³ (die 5fache Menge der zur Verbrennung benützten Schwefelsäure) 33 $\frac{1}{3}$ % iger Natronlauge zufließen, stülpt den Gummistopfen schnell vollends in den Kolbenhals, schüttelt um und steckt sogleich die Flamme an. Das in den Kjeldahl-Kolben durch den Gummistopfen hineinragende Destillationsrohr muß einen Kugelaufsatz (s. Abb 51) haben, um das Verspritzen von Natronlauge in die Vorlage zu verhüten. 20–30 Minuten nach Beginn des Kochens ist die Destillation beendet, was eventuell durch starkes Stoßen der Flüssigkeit infolge Ausscheidung von Natriumsulfat zu erkennen ist. Um sicher zu gehen, daß kein Ammoniak mehr übertritt, füllt man ein Reagensglas mit einigen Kubikzentimetern Wasser und 2–3 Tropfen Methylorange und schiebt das Ende des

Destillationsrohres aus dem Erlenmeyer-Kolben schnell in das Reagensglas, worin es etwa 1–2 Minuten verbleibt; falls die Farbe des Wassers nicht in Rot umschlägt, ist die Destillation beendet; findet hingegen ein Farbumschlag in Rot statt, so wird das Ende des Destillationsrohres schnell wieder in den Erlenmeyer-Kolben gebracht und der Inhalt des Reagensglases unter mehrfachem Nachspülen in die Vorlage gegossen. Sollte die Farbe der Vorlage selbst in Rot umschlagen, so hat man zu wenig Schwefelsäure vorgelegt und muß die Bestimmung wiederholen. Nach beendeter Destillation wird bis zur bleibenden Rotfärbung mit $n/10$ Natronlauge titriert. Die Anzahl der hierfür verbrauchten Kubikzentimeter $n/10$ Lauge wird von den vorgelegten Kubikzentimetern $n/10$ Säure subtrahiert, die Differenz, multipliziert mit 0,0014, ergibt die Zahl des in der verwandten Harnmenge vorhandenen Stickstoffes in Gramm, woraus sich der prozentuale N-Gehalt durch Multiplikation mit 20 ergibt. Umrechnen auf die Gesamttagesharnmenge.

F. Bestimmung des Aminosäurenstickstoffes durch Formoltitration nach Henriques¹⁾–Frey–Gigon²⁾.

Prinzip: Die schwach sauren Aminosäuren werden durch Formolzusatz in ihre stark sauren Methylenverbindungen übergeführt und können als solche acidimetrisch bestimmt werden. Das störende Ammoniak des Harns wird vorher entfernt und kann dabei gleichzeitig bestimmt werden.

Erforderliche Reagenzien:

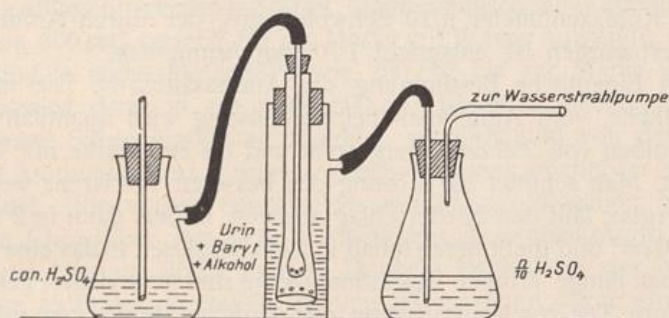
1. Konzentrierte Barythydratlösung.
2. $n/5$ Salzsäure.
3. $n/5$ Natronlauge.
4. $n/10$ Schwefelsäure.
5. $n/10$ Natronlauge.
6. 40 % ige Formollösung (die übliche käufliche Lösung des Formaldehyd ist 40 % = Formalin).
7. 1 % ige alkoholische Rosolsäurelösung.
8. 1 % ige alkoholische Phenolphthaleinlösung.
9. 0,1 % ige wässrige Methylorangelösung.

Ausführung: a) Entfernung des Ammoniaks. 50 cm^3 Harn werden in einem hohen Meßcylinder mit seitlichem Ansatzrohr mit 20 cm^3 der Barythydratlösung und 15 cm^3 absolutem Alkohol versetzt. Die Vorlage, in die das frei werdende Ammoniak übergetrieben werden soll, besteht aus einem Erlenmeyer-Kolben (s. Abb. 52), der mit 25 cm^3 $n/10$ Schwefel-

¹⁾ Henriques, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1909, Bd. 60, S. 1. — ²⁾ Frey-Gigon, Biochem. Zeitschr. 1909, Bd. 22, S. 309.

säure, etwas Wasser, so daß das Glasrohr gut eintaucht, und einigen Tropfen Methylorange beschickt ist. Der Erlenmeyer-Kolben wird mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen, durch dessen Bohrungen rechtwinkelig gebogene Glasröhren hindurchgehen. Eine in den Meßcylinder hineinreichende Glasröhre, die unten kolbig aufgetrieben und durchlöchert ist, bis dicht auf des Cylinders Boden hinabreicht und tief in die darin befindliche Flüssigkeit eintaucht, endet an ihrem äußeren Ende frei und wird durch einen Gummischlauch mit einem zweiten Gefäß mit seitlichem Ansatzrohr verbunden, in das durch einen durchbohrten Stopfen eine Glasröhre gesteckt wird; dieses Gefäß wird mit

Abb. 52.



soviel konzentrierter Schwefelsäure gefüllt, daß die Glasröhre etwa 2 cm tief darin eintaucht; die Schwefelsäure dient zum Abfangen des etwa in der Luft enthaltenen Ammoniaks. Das seitliche Ansatzrohr des Cylinders wird durch ein kurzes Stück starken Gummischlauch mit derjenigen Glasröhre verbunden, die durch die eine Bohrung des Stopfens bis dicht auf den Boden des Erlenmeyer-Kolbens hinabreicht, während dessen zweite Glasröhre innen dicht unterhalb des Stopfens endet, außen aber mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung gesetzt wird. Sobald diese nun in Betrieb gesetzt wird, treibt sie einen ammoniakfreien Luftstrom durch die im Standcylinder enthaltene Flüssigkeit hindurch, der dann weiterhin die Flüssigkeit im Erlenmeyer-Kolben passiert und das im Standcylinder frei werdende Ammoniak in die Flüssigkeit der Vorlage hinübertreibt, wo es an die $n/10$ Schwefelsäure gebunden wird. Nachdem die Barythydratlösung zu dem Urin hinzugefügt ist, werden die Verbindungen der soeben beschriebenen Apparatur geschlossen und die Wasserstrahlpumpe in Tätigkeit gesetzt. Man läßt 2–3 Stunden einen nicht zu starken Luftstrom durch

das System hindurchgehen, entfernt dann die $n/10$ Schwefelsäure enthaltende Vorlage und ersetzt sie durch eine neue, die nur Wasser und den Indikator enthält. Wird bei neuem Durchleiten eines Luftstromes die Flüssigkeit in der neuen Vorlage nicht mehr rot, so ist alles Ammoniak aus dem Urin entfernt, ist dies aber doch der Fall, so muß schnell der Inhalt der neuen Vorlage unter Nachspülen in die alte überführt und mit dem Durchleiten des Luftstromes noch weiter fortgefahren werden, bis alles Ammoniak aus dem Urin entfernt ist. Die $n/10$ Schwefelsäure enthaltende Vorlage wird dann mit $n/10$ Natronlauge bis zur bleibenden Rotfärbung titriert, die Differenz zwischen vorgelegter Säure und der zum Zurücktitrieren erforderlichen Lauge ergibt die Menge der durch Ammoniak neutralisierten Säure. Jeder Kubikzentimeter $n/10$ Schwefelsäure, der durch Ammoniak neutralisiert worden ist, entspricht 1.703 mg Ammoniak.

b) Eigentliche Bestimmung des Aminosäuren-N. Die im Cylinder befindliche, vom Ammoniak befreite Lösung wird quantitativ in einen Meßkolben von 250 cm^3 übergespült und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Man schüttet die Lösung des besseren Filtrierens wegen in ein Becherglas, läßt den Niederschlag absitzen, filtriert dann in 2 Meßkolben zu 100 cm^3 und gießt deren Inhalt in 2 Bechergläser. In das eine Becherglas fügt man einige Tropfen Rosolsäurelösung und neutralisiert genau mit $n/5$ Salzsäure. Die zur Neutralisation erforderliche Menge von $n/5$ Salzsäure wird nun, genau abgemessen, in das zweite Becherglas gegeben und weiterhin 10 cm^3 gegen Phenolphthalein als Indikator genau neutralisierte Formollösung (s. Ammoniakbestimmung nach Ronchèse-Malfatti, I., D.) hinzugefügt. In dem Gemisch tritt nun eine saure Reaktion auf. Es werden noch einige Tropfen Phenolphthalein hinzugefügt und mit $n/5$ Natronlauge bis zur rotvioletten Farbe neutralisiert. Jeder Kubikzentimeter der hierfür verbrauchten Lauge entspricht 2.8 mg Aminostickstoff. Da der Titration 20 cm^3 Harn zu grunde gelegt sind, ergibt die Multiplikation mit 5 den prozentualen Gehalt des Urins an Amino-N in Milligrammen.

G. Harnsäurebestimmung nach Salkowski¹⁾.

Prinzip: Die Harnsäure wird aus einer verdünnten Lösung durch ammoniakalische Silberlösung bei Anwesenheit von Magnesiasalzen als harnsaure Silbermagnesia gefällt, diese Verbindung durch Schwefelwasserstoff unter Bildung von Schwefelsilber wieder zerlegt, die als

¹⁾ Salkowski, Virchows Arch. 1871, Bd. 52, S. 58. — Pflügers Arch. 1872, Bd. 5, S. 210.

Salz in Lösung gehende Harnsäure in der eingeeengten Flüssigkeit durch Salzsäure gefällt und gewogen oder durch Bestimmung ihres N-Gehaltes nach Kjeldahl berechnet.

Erforderliche Reagenzien:

1. 3%ige Silbernitratlösung.
2. Magnesiamischung: 100 g krystallisiertes Magnesiumchlorid und 200 g Ammoniumchlorid werden in etwa 500 cm³ Wasser gelöst und mit Ammoniak versetzt, bis die Lösung stark darnach riecht. Mit Wasser auf 1 l auffüllen.

3. Konzentrierte Salzsäure.

4. Kippscher Apparat zur Bildung von Schwefelwasserstoff.

Ausführung: 200 cm³ Harn (Harn mit spec. Gew. über 1020 sind vorher zu verdünnen!) werden mit 50 cm³ Magnesiamischung in einem Meßcylinder von 300 cm³ versetzt, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, umgeschüttelt und in einen Meßkolben von 200 cm³ bis zur Marke filtriert. Das Filtrat wird dann in ein etwa 500 cm³ fassendes Becherglas gegossen, 15 cm³ Silbernitratlösung zugefügt, verrührt, und von der Seite her so viel Ammoniak hinzugefügt, bis sich ein feiner gelatinöser Niederschlag bildet. (Ein vorher entstehender weißer, großflockiger Niederschlag von Chlorsilber löst sich bei weiterem Ammoniakzusatz). Man läßt nun die Lösung einige Zeit im Dunkeln stehen, bis der Niederschlag ganz zu Boden gesunken ist, und filtriert dann durch ein Filter von 9 cm Durchmesser (Schleicher u. Schüll Nr. 597), indem man zunächst nur die überstehende klare Flüssigkeit und erst zum Schluß den Niederschlag auf das Filter bringt. Das Becherglas wird wiederholt mit Wasser nachgespült und der Filtrerrückstand so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser chlorfrei ist (d. h. keine Trübung mit Silbernitrat mehr gibt). Dann setzt man das Filter auf ein Erlenmeyer-Kölbchen, stößt das Filter durch und spült durch die entstandene Öffnung den Filtrerrückstand mit Wasser quantitativ in das Kölbchen hinein, setzt einige Tropfen Salzsäure bis zur deutlichen sauren Reaktion (Lackmuspapier) hinzu und leitet Schwefelwasserstoff in die Lösung ein, bis eine schwarze Färbung auftritt. Nun erhitzt man auf dem Wasserbad, filtriert heiß schnell durch ein Faltenfilter mit etwas Kieselgur in eine Abdampfschale aus Porzellan und spült das Filter mit etwas heißem Wasser nach. Das Filtrat muß völlig wasserklar sein, andernfalls ist die Filtration heiß noch einmal zu wiederholen. Das Filtrat wird nun auf dem Wasserbad bis auf etwa 20 cm³ eingeeengt und dann 2,5 cm³ konzentrierte Salzsäure hinzugefügt; die Schale bleibt nun bedeckt 24 Stunden stehen. Es wird dann in einem Wiegegläschen ein kleines Filter im Wärmeschrank bei 90° 1 Stunde getrocknet, gewogen und im Exsikkator aufgehoben.

Auf dieses Filter wird der nach Salzsäurezusatz in 24 Stunden entstandene Harnsäureniederschlag gebracht, das Filter mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion im Waschwasser und zum Trocknen mit Alkohol und Äther gespült, wiederum 1 Stunde bei 90° getrocknet, im Exsikkator erkalten gelassen und gewogen. Die Gewichts Differenz ergibt die Harnsäuremenge in der verarbeiteten Harnportion.

Statt den Niederschlag zu wägen, kann man ihn auch in einen Kjeldahl-Kolben überspülen und seinen N-Gehalt bestimmen. Der gefundene N-Wert multipliziert mit 3 ergibt die Harnsäuremenge.

Berechnung: Die durch Wägung oder Bestimmung des N-Gehaltes gefundene Harnsäuremenge multipliziert mit 0.75 ergibt den prozentualen Harnsäuregehalt des Urins.

H. Purinbasenbestimmung nach Camerer¹⁾-Arnstein²⁾.

Prinzip: Nach Ausfällung der Phosphate werden Harnsäure + Purinbasen als Silberverbindungen gefällt und der N im Niederschlag bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. Ammoniakalische Silberlösung: 26 g salpetersaures Silber werden in Wasser gelöst und die Lösung mit so viel Ammoniak versetzt, daß der anfangs entstehende braune Niederschlag von Silberoxyd wieder in Lösung geht. Dann mit Wasser auf 1 l auffüllen.

2. Magnesiamischung (s. voraufgehende Harnsäurebestimmung nach Salkowski).

3. 20 % iges Ammoniak.

4. Magnesia usta.

5. Reagenzien zum Kjeldahl.

Ausführung: 240 cm³ Harn werden in einem 300 cm³ Meßcylinder mit 30 cm³ Magnesiamischung und 30 cm³ 20 % igem Ammoniak aufgefüllt, durchgeschüttelt und gleich filtriert. Vom Filtrat werden 125 cm³ abgemessen und mit 10 cm³ ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Nun wird durchgerührt, der entstehende Niederschlag etwas absitzen gelassen und durch ein aschefreies Filter filtriert; das Filtrat muß ganz klar sein. Der Filterrückstand wird mit Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser ammoniakfrei ist (Lackmus nicht mehr rot färbt). Filter und Niederschlag werden nun in einen Kjeldahl-Kolben gebracht, mit etwas Wasser und einer Messerspitze Magnesia usta 15 Minuten gekocht, abgekühlt, mit 15 cm³ konzentrierter Schwefelsäure und etwas Kupfer-

¹⁾ Camerer, Zeitschr. f. Biol. 1890, Bd. 8 (neue Folge), S. 84. — ²⁾ Arnstein, ebenda 1891, Bd. 10, S. 72.

sulfat versetzt und weiter nach Kjeldahl (s. I., E.) verarbeitet. Man erhält dann den Purin-N in der verarbeiteten Harnmenge (100 cm^3), also in Grammprozenten.

I. Harnstoffbestimmung nach Marschall, modifiziert nach Strohmann und Flintzer¹⁾.

Prinzip: Der Harnstoff wird durch die Urease, das Ferment der Sojabohne, in Ammoniak umgesetzt, das titrimetrisch bestimmt wird.

Erforderliche Reagenzien:

1. Ureaseextrakt: Man bringt in einen 200-cm^3 -Kolben etwa 3 g Permutit und wäscht ihn unter Dekantieren einmal mit 2% iger Essigsäure und 2mal mit Wasser aus. Zum feuchten Permutit gibt man 100 cm^3 30% igen Alkohol (33 cm^3 95% igen Alkohol + 70 cm^3 Wasser), dann 5 g Soja-(oder Jack-)Bohnenmehl und schüttelt 10 Minuten lang durch. Man filtriert und fängt das Filtrat in 3–4 kleinen sauberen Flaschen auf. Die eine benutzt man zum unmittelbaren Gebrauch; bei gewöhnlicher Temperatur und vor Sonnenlicht geschützt bleibt der Inhalt mindestens eine Woche lang benutzbar. Die andern stellt man auf Eis, wo sie sich 3–5 Wochen lang halten. In Gegenwart einer geeigneten Phosphatmischung (2) entwickelt 1 cm^3 der Fermentlösung aus 300 mg Harnstoff in einem Volumen von 200 cm^3 $37\text{--}42\text{ mg}$ Harnstoff-N in einer Stunde bei 20°C . In 18 Stunden ist der gesamte Harnstoff zersetzt. Die Anwendung des Permutits befreit den Extrakt von Ammoniak und verhindert die Entwicklung weiteren Ammoniaks beim Stehenlassen.

2. Phosphatlösung (Pufferlösungen): Sie enthalten Mononatriumphosphat und Dinatriumphosphat im molekularen Verhältnis von 1:1 oder 1:2, oder $140\cdot0$ Natriumpyrophosphat und $20\cdot0$ glasige Phosphorsäure, ad $1000\cdot0$ mit Wasser gelöst.

3. $n/20$ Schwefelsäure.

4. Lösung von alizarinsulfosaurem Natrium als Indikator.

Ausführung: 5 cm^3 einer 25% igen Harnverdünnung (10 cm^3 Harn auf 40 cm^3 Wasser) werden mit 1 cm^3 Fermentextrakt und 2 Tropfen Pufferlösung versetzt und im Wasserbad 3 Stunden auf etwa 55° erwärmt oder bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Darnach wird mit $n/20$ Schwefelsäure mit Alizarin als Indikator titriert. Die Titration ist erst dann beendet, wenn der hereinfallende Säuretropfen die Lösung nicht mehr gelb färbt. Der Umschlag ist scharf und gut zu beobachten. Vorherzugehen hat der Ausführung eine Bestimmung

¹⁾ Strohmann u. Flintzer, Zbl. f. innere Med. 1921, Nr. 27.

der Alkalität des Fermentextraktes und der Harnverdünnung, schwach saure Harne sind auf ihre Acidität zu titrieren und durch Alkalizusatz zu neutralisieren. Das präformierte Ammoniak wird ebenfalls bei dieser Titration bestimmt und erscheint bei der Gesamtalkalität.

Die Fermentlösung darf nie in Gläser kommen, in denen Quecksilberverbindungen gewesen sind, da auch nur Spuren von Quecksilber das Ferment abtöten.

Berechnung: Jeder verbrauchte Kubikzentimeter $n/20$ Schwefelsäure entspricht 0.8585 mg Ammoniak oder 1.51 mg Harnstoff; die bei Bestimmung der Gesamtalkalität erhaltenen Kubikzentimeter $n/20$ Säure sind vor der Multiplikation abzuziehen.

K. Bestimmung von Kreatinin und Kreatin nach Folin¹⁾.

Prinzip: Kreatinin gibt mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung eine Rotfärbung, deren Intensität mit einer Kaliumbichromatlösung oder einer alkalischen Pikrinsäure-Kreatininlösung (frisch zubereitet) von bekanntem Kreatiningehalt kolorimetrisch verglichen wird. Das Kreatin wird durch Erhitzen mit Salzsäure im Autoklaven in Kreatinin übergeführt; die Differenz zwischen dem so gefundenen „Gesamtkreatinin“ und dem vorher bestimmten „präformierten“ Kreatinin ergibt das Kreatin.

Erforderliche Reagenzien:

1. $n/10$ Kaliumbichromatlösung.
2. 1.2% ige Pikrinsäurelösung (aus reinster, ganz trockener, nicht klumpiger Pikrinsäure!).
3. 10% ige Natronlauge.
4. $n/1$ Natronlauge.
5. $n/1$ Salzsäure.

a) Ausführung der Kreatininbestimmung: 10 cm^3 Urin werden mit einer Vollpipette abgemessen und in einen 500-cm^3 -Meßkolben gebracht, dazu 15 cm^3 Pikrinsäure und 5 cm^3 (genau!) 10% ige Natronlauge zugefügt, umgeschüttelt und 10 Minuten stehen gelassen. Die Pikrinsäure fällt das Eiweiß aus, das die Natronlauge wieder löst. Nun wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und kräftig durchgeschüttelt. Mit dieser Lösung wird nun das 2. Colorimeterrohr (z. B. Duboscq'sches Colorimeter) ausgespült und dann gefüllt. In das 1. Colorimeterrohr kommt dann die Bichromatlösung (oder 10 cm^3 einer passenden, frisch verdünnten Kreatininlösung, die in gleicher Weise mit Pikrinsäure, Natron-

¹⁾ Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1904, Bd. 41, S. 223. — Journ. of. Biol. Chem. 1914, Bd. 17, S. 469 und 1915, Bd. 22, S. 327.

lauge und mit Wasser verdünnt ist wie der Harn; wichtig ist dabei, daß der Natronlaugezusatz bei beiden Lösungen ganz genau der gleiche ist). Bei der Colorimetrie stellt man bei dem Duboscq'schen Colorimeter das 1. Rohr auf 40 mm (bei Verwendung von Kreatininvergleichslösung auf 20 mm) ein und dreht das 2. so lange herauf oder herunter, bis bei mehrfach wiederholter Ablesung (eventuell mehrerer Beobachter) Farbgleichheit besteht. Die abgelesene Zahl muß zwischen 7 und 15 (bei Kreatininvergleichslösung zwischen 13 und 30) liegen, andernfalls ist die Bestimmung ungenau und muß, je nach Ausfall des Resultats, mit kleineren (halben) oder größeren (doppelten) Urinmengen wiederholt werden.

Berechnung: Die Kaliumbichromatlösung ist so gewählt, daß eine Lösung von 10 mg Kreatinin (mit 5 cm³ Natronlauge und 15 cm³ Pikrinsäure auf 500 aufgefüllt) 8:1 erfordern, um dieselbe Farbe wie 8 mm der Testlösung zu liefern. Daraus berechnet sich der Kreatiningehalt des zu untersuchenden Harnes wie folgt: Ist x der abgelesene Colorimeterwert, so ist der Kreatiningehalt der verwendeten 10 cm³ Urin $= \frac{8 \cdot 1 \cdot 10}{x} = \frac{81}{x}$. Weitere Multiplikation mit dem 10. Teil der Tagesmenge ergibt das in dieser vorhandene Kreatinin.

b) Ausführung der Kreatinbestimmung: 10 cm³ Harn werden mit 10 cm³ n/1 Salzsäure 1 Stunde in einem Autoklaven erhitzt, dann mit 10 cm³ n/1 Natronlauge versetzt und in einen 500-cm³-Meßkolben übergeführt, wo 15 cm³ Pikrinsäurelösung und 5 cm³ 10% ige Natronlauge zugefügt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und dann genau wie bei der Kreatininbestimmung verfahren wird.

Berechnung: Wie beim Kreatinin. Der gefundene Wert ergibt das Gesamtkreatinin, von dem der des präformierten Kreatinins abgezogen wird, um das Kreatin, ausgedrückt in Kreatinin, zu erhalten. Um in Kreatin umzurechnen, wird die erhaltene Differenz mit 1.16 multipliziert.

L. Kochsalz-(Chlor-)Bestimmung nach Volhard¹⁾, modifiziert nach Arnold²⁾.

Prinzip: In dem durch Salpetersäure angesäuerten Urin werden die Chloride durch einen Überschuß von Silbernitratlösung ausgefällt und das überschüssige Silbernitrat mit Rhodanammmonium zurücktitriert; als Indikator hierfür dient Eisenammoniakalaun.

¹⁾ Volhard, Liebigs Annal. d. Chem. 1878, Bd. 190, S. 1–61. — ²⁾ Arnold, Pflügers Arch. 1885, Bd. 35, S. 541–557.

Erforderliche Reagenzien:

1. n/10 Silbernitratlösung.
2. n/10 Rhodanammiumlösung.
3. Kalt gesättigte Lösung von Eisenammoniakalaun (Ferri-Ammonium sulfuricum).
4. Konzentrierte Salpetersäure (chlorfrei).
5. Konzentrierte Kaliumpermanganatlösung.

Ausführung: 10 cm^3 (eventuell enteweißter!) Urin werden in einem 100- cm^3 -Meßkölbchen mit 4–5 cm^3 konzentrierter Salpetersäure, 2 cm^3 Eisenammoniakalaunlösung und 3–4 Tropfen Kaliumpermanganatlösung versetzt und umgeschüttelt; der Harn nimmt dabei eine hellgelbe Farbe an. Ist dies nicht der Fall, so wird so lange tropfenweise Permanganatlösung zugesetzt, bis die Farbe hellgelb wird. Dann läßt man aus einer Bürette so viel n/10 Silbernitratlösung zufließen, bis die zufließende Lösung keinen weiteren Niederschlag von Chlorsilber mehr hervorruft. Im allgemeinen genügen hierzu 30 cm^3 . Man füllt nun das Meßkölbchen bis zur Marke mit Wasser, schüttelt gut durch und filtriert durch ein trockenes Filter mit etwas Kieselgur in ein 50- cm^3 -Meßkölbchen. Die so erhaltenen 50 cm^3 Filtrat werden in ein Becherglas umgegossen und dann mit Rhodanammiumlösung bis zur Rotfärbung der Flüssigkeit titriert.

Berechnung: Die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter Rhodanammiumlösung multipliziert man mit 2 und zieht die so erhaltene Zahl von der Anzahl der vorgelegten Kubikzentimeter Silbernitratlösung ab. Die Differenz mit 0.00585 multipliziert, ergibt den Kochsalzgehalt (genauer den Gehalt der Chloride, ausgedrückt als Chlornatrium) in Grammen in 10 cm^3 Harn.

M. Phosphorbestimmung.

1. Feuchte Veraschung nach Neumann¹⁾ zur Vorbereitung für die alkalimetrische Phosphorbestimmung.

Prinzip: Die Oxydation wird bewirkt durch ein Gemisch von Schwefelsäure und Salpetersäure. Da es niemals zu einer Verkohlung kommt (Kohlebildung verlangsamt die Oxydation), so geht die Veraschung schnell vor sich.

Erforderliches Säuregemisch: 20 cm^3 konzentrierte Salpetersäure (spec. Gew. 1.4) wird mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure gemischt.

¹⁾ Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1902, Bd. 37, S. 115. — Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abteil. 1897, S. 552; 1900, S. 159; 1902, S. 362.

Ausführung: 20 cm^3 Harn (bei Untersuchung größerer Mengen auf dieses Volumen eindampfen!) werden in einen 300- cm^3 -Kjeldahl-Kolben gegeben, dazu 10 cm^3 des Säuregemisches. Weitere 10 cm^3 Säuregemisches werden in einen Hahntrichter getan, dessen unteres Ende in den Hals des Kjeldahl-Kolbens hineinreicht. Nun wird der schräg stehende Kjeldahl-Kolben mit kleiner Flamme im Abzug erwärmt, wobei sich braune Nitrosedämpfe entwickeln. Sobald die Dampfentwicklung nachläßt, werden einige weitere Tropfen des Säuregemisches aus dem Hahntrichter zugegeben. Man fährt so mit der tropfenweise, immer wieder unterbrochenen Zugabe des Säuregemisches fort, bis die Flüssigkeit im Kolben sich nach Verschwinden der Nitrosedämpfe bei weiterem Kochen nicht mehr dunkler färbt, sondern hellgelb bleibt und auch keine Gasentwicklung mehr zeigt, ein Zeichen, daß die organische Substanz völlig zerstört ist. Ist die kochende Flüssigkeit hellgelb, so wird sie beim Erkalten wasserklar, und die Veraschung ist beendet. Man setzt nun noch vorsichtig etwa 3mal so viel Wasser hinzu als Säuregemisch verbraucht wurde, und kocht 5–10 Minuten, wobei von der Zersetzung der gebildeten Nitrosylschwefelsäure herrührende braune Dämpfe entweichen. Die so erhaltene Lösung der Aschenbestandteile dient zur Untersuchung auf alle Basen und nichtflüchtige Säuren, mit Ausnahme natürlich von Schwefel- und Salpetersäure.

2. Alkalimetrische Phosphorbestimmung nach Neumann¹⁾.

Prinzip: Aus der durch Säuregemischveraschung zerstörten Substanz wird nach bestimmten Vorschriften die Phosphorsäure als Ammoniumphosphormolybdat gefällt. Der ausgewaschene Niederschlag wird sodann in $n/2$ Natronlauge gelöst, nach dem Fortkochen des Ammoniaks mit $n/2$ Schwefelsäure zurücktitriert. Da 1 Molekül P_2O_5 des gelben Niederschlages bei dieser Behandlung zu seiner Neutralisation unter Anwendung von Phenolphthalein 56 Moleküle Natronlauge erfordert, so entsprechen jedem verbrauchten Kubikzentimeter $n/2$ Natronlauge 1,268 mg P_2O_5 .

Erforderliche Reagenzien:

1. 50 % ige Ammonnitratlösung.
2. $n/2$ Natronlauge.
3. $n/2$ Schwefelsäure.
4. 1 % ige alkoholische Phenolphthaleinlösung.
5. 10 % ige Ammonmolybdatlösung (kalt gelöst und filtriert).

Ausführung: Der Urin wird der Säuregemischveraschung (s. o.) unterworfen. Unter der Annahme, daß für die Veraschung nicht mehr

¹⁾ Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1902, Bd. 37, S. 129.

als 40 cm^3 Säuregemisch¹⁾ verwendet wurden, werden 140 cm^3 Wasser hinzugegeben. Sind mehr als 40 cm^3 Säuregemisch verbraucht worden, so ist die Verdünnung mit Wasser und Ammonnitrat in demselben Verhältnis zu vermehren. Der 5. Teil der Gesamtflüssigkeit muß 50% Ammonnitrat sein. Nach dem Zufügen des Ammonnitrats (bei maximal 40 cm^3 Säuregemisch also 50 cm^3) wird auf etwa 70–80° erhitzt, d. h. bis gerade Blasen aufsteigen; darauf werden 40 cm^3 Ammoniummolybdatlösung²⁾ zugegeben. Man schüttelt den entstandenen Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammoniak etwa eine halbe Minute tüchtig durch, wodurch sich derselbe körnig abscheidet, und läßt 15 Minuten in einem Stativring stehen. Das Filtrieren und Auswaschen geschieht durch Dekantieren. Am besten filtriert man langsam an der Saugpumpe durch ein aschefreies Filter. Um ein Durchgehen der sehr feinen Körnchen durch das Filter zu vermeiden, muß die Flüssigkeit und das Filter ständig eisgekühlt sein. In den Trichter gibt man einen Platinconus, darauf das aschefreie Filter von 5–6 cm Radius und jetzt etwas feines Eis, um die Filterporen zu schließen, und gießt darüber noch etwas eisgekühltes Wasser. Nun filtriert man langsam aber stetig, durch vorsichtiges Neigen des schräg auf einem Stativring etwas oberhalb des Filters befindlichen Kolbens die überstehende Flüssigkeit ab, doch so, daß so wenig wie möglich von dem Niederschlag auf das Filter kommt, indem man den ständigen Zufluß je nach der Schnelligkeit des Abflusses reguliert. Das Filter soll nie mehr als bis zu $\frac{2}{3}$ seines Volumens gefüllt sein soll. Nunmehr wird der im Kolben verbliebene Niederschlag unter vollständiger Bespülung der Kolbenwandungen mit 150 cm^3 eiskalten Wassers heftig durchgeschüttelt und dann im Stativring wieder absitzen gelassen. Während dessen wird auch das Filter 2mal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Man dekantiert dann wieder, wie oben beschrieben, und wiederholt das Auswaschen noch 3–4mal, bis das Waschwasser gerade nicht mehr sauer gegen Lackmus reagiert. Das Auswaschen muß ohne Unterbrechung vor sich gehen, weil der gelbe Niederschlag bei längerer Berührung mit Wasser in diesem nicht ganz unlöslich ist.

Nunmehr gibt man das ausgewaschene Filter in den Kolben zurück, zu der Hauptmenge des Niederschlages, fügt etwa 150 cm^3 Wasser hinzu, zerteilt durch heftiges Schütteln das Filter durch die ganze Flüssigkeit und löst den gelben Niederschlag, indem man aus einer Bürette ge-

¹⁾ Es soll bei der Veraschung außer den anfangs zugesetzten 10 cm^3 möglichst wenig Säuregemisch verbraucht werden. Aus diesem Grunde muß die Temperatur bei der Veraschung möglichst niedrig gehalten werden. — ²⁾ Die Substanzmenge ist so zu wählen, daß sie nicht mehr als 50 mg P_2O_5 enthält.

messene Mengen $n/2$ Natronlauge zugibt, unter beständigem Schütteln und ohne zu erwärmen eben gerade zu einer farblosen Flüssigkeit auf. Sodann wird ein Überschuß von $5-6\text{ cm}^3$ $n/2$ Natronlauge hinzugefügt und die Flüssigkeit so lange (etwa 15 Minuten) gekocht, bis mit den Wasserdämpfen kein Ammoniak mehr entweicht (Prüfung mit feuchtem Lackmuspapier). Nachdem die Flüssigkeit unter der Wasserleitung völlig abgekühlt ist, wird ihr Volumen auf etwa 150 cm^3 ergänzt und nach Hinzufügen von 6–8 Tropfen Phenolphthalein (die starke Rötung ergeben muß, andernfalls noch Natronlauge zufügen und nochmals das Ammoniak auskochen!) mit $n/2$ Schwefelsäure zurücktitriert, bis die rote Farbe verschwindet.

Berechnung: Die Anzahl der zugefügten Kubikzentimeter $n/2$ Natronlauge abzüglich der bei der Rücktitration verbrauchten Kubikzentimeter $n/2$ Schwefelsäure ergeben, mit 1·268 multipliziert, die in der verarbeiteten Harnmenge enthaltene Menge P_2O_5 in Milligrammen.

3. Phosphorsäurebestimmung nach Pinkus¹⁾-Neubauer²⁾.

Prinzip: Versetzt man ein wasserlösliches phosphorsaures Salz in heißer Lösung bei Anwesenheit freier Essigsäure mit einer Lösung von Uranylacetat, so entsteht sofort eine quantitative Fällung von Uranylphosphat. Der Überschuß von Uranylacetat ist zu erkennen an einer Tüpfelreaktion mit Ferrocyankalium: Endreaktion. Der Essigsäurezusatz hat den Zweck, alle Phosphate in Diphosphate überzuführen.

Erforderliche Reagenzien:

1. Natriumammoniumphosphatlösung (entsprechend $5\cdot0\text{ P}_2\text{O}_5$ im Liter) = $14\cdot719\text{ g}$ in Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.

2. Uranylacetatlösung (entsprechend $5\cdot0\text{ P}_2\text{O}_5$ im Liter) = 35 g reines Uranylacetat auf 1 l Wasser unter Zusatz von etwas Essigsäure (eventuell erwärmen) und filtrieren. In gelber Flasche geschützt aufbewahren, auf Lösung 1. einstellen (s. u.).

3. Natriumacetatessigsäuremischung: $100\cdot0$ krystallisiertes Natriumacetat im Wasser gelöst, 100 cm^3 30% ige Essigsäure zugesetzt, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt.

4. 10% ige Ferrocyankaliumlösung.

Einstellung der Uranlösung: 50 cm^3 Natriumammoniumphosphatlösung werden in einem Becherglas von etwa 200 cm^3 mit 5 cm^3 der Natriumacetatessigsäuremischung versetzt und bis zum beginnenden

¹⁾ Pinkus, Virchows Arch. 1859, Bd. 16, S. 137. — ²⁾ Neubauer, Arch. f. wissenschaftl. Heilkunde 1860, Bd. 4, S. 228; 1861, Bd. 5, S. 319.

Sieden erhitzt. Nun läßt man aus einer Bürette in kleinen Mengen Uranylacetat zufließen, wobei sich ein grüner Niederschlag von Uranylphosphat bildet. Auf eine Porzellanplatte hat man mittels eines Glasstabes zahlreiche Ferrocyankaliumtropfen gemacht. Nach jedem Zusatz aus der Bürette wird wieder zum beginnenden Sieden erhitzt und dann mit dem Glasstab ein Tropfen aus dem Becherglas auf die Porzellanplatte gebracht, so daß er mit einem Ferrocyankaliumtropfen zusammenfließt. Die geringste Menge von freiem Uranylacetat im Becherglas zeigt sich an einer braunroten Färbung (Uranylferrocyanid) an der Berührungsstelle der beiden Tropfen. Allerdings tritt bei geringen Uranmengen die Färbung nicht sofort deutlich hervor, und man muß 15–30 Sekunden warten. Ist nach dieser Zeit keine Braunfärbung aufgetreten, so wird eine weitere Portion Uranlösung ins Becherglas gegeben, wieder erhitzt, getüpfelt u. s. w. Anfangs, solange man eine Zunahme des Niederschlags beobachtet, kann man größere Mengen Uranylacetat zufließen lassen; späterhin wird man nach je $\frac{1}{2} \text{ cm}^3$ die Tüpfelprobe wiederholen. Nachdem man auf diese Weise annähernd richtig titriert hat, setzt man einen neuen Versuch an, bei dem man die gesamte, bei dem Vorversuch gebrauchte Menge Uranlösung bis auf 1–2 cm^3 langsam auf einmal zufließen läßt, erhitzt, und nun immer wieder nach Zusatz je eines Tropfens Uranylacetat die Tüpfelprobe wiederholt. Aus mehreren derartigen Analysen nimmt man den Mittelwert. Die Uranlösung ist dann so zu verdünnen, daß dieser Mittelwert auf 50 cm^3 verdünnt wird (entsprechend den vorgelegten 50 cm^3 Phosphatlösung). Dann wird nochmals titriert und eventuell wieder eingestellt.

Ausführung: 50 cm^3 Urin werden in einem Becherglas mit 5 cm^3 Acetatmischung versetzt und genau so weiter verfahren wie bei der Einstellung der Uranylacetatlösung.

Berechnung: Jeder Kubikzentimeter verbrauchten Uranylacetats entspricht laut Einstellung 0.005 g P_2O_5 .

Zucker und geringe Eiweißmengen brauchen vor Anstellung der Phosphorbestimmung nicht entfernt zu werden; bei größeren Eiweißmengen aber vorher enteiweißen!

N. Gewichtsanalytische Bestimmung von Calcium und Magnesium nach Mohr und Beuttenmüller.

Prinzip: Der Harn (bzw. die Veraschungsflüssigkeit nach Neumann [s. o. I., M., 1.]) wird in essigsaurer Lösung mit oxalsaurem Ammonium ausgefällt, der oxalsaure Kalk geglüht und als Calciumoxyd gewogen.

Das Filtrat des oxalsauren Kalks wird ammoniakalisch gemacht, das Magnesium mit Natriumphosphat als Tripelphosphat niedergeschlagen und nach Glühen als Magnesiumpyrophosphat gewogen.

Erforderliche Reagenzien:

1. 10 % ige Ammoniumoxalatlösung.
2. 10 % ige Ammoniumcitratlösung.
3. 10 % ige Dinatriumphosphatlösung.
4. 2,5 % ige Ammoniaklösung.
5. 20 % ige Salpetersäure.

Ausführung: a) Calcium: 200 cm^3 saurer (unzersetzt!) Harn (resp. die aus derselben Harnmenge nach Neumann hergestellte und mit starkem Ammoniak neutralisierte Aschenlösung) werden in ein Becherglas von $\frac{1}{2}$ l gefüllt. Nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure fügt man einen Überschuß von Ammoniumoxalat hinzu (etwa 50 cm^3 genügen), setzt das Becherglas aufs Wasserbad und erhitzt. Der allmählich ausfallende Niederschlag setzt sich in Verlauf einiger Stunden (auf dem Wasserbad belassen!) zu Boden. Nun wird durch ein aschefreies Filter sorgfältig abfiltriert, wobei man anfangs den Niederschlag nicht aufrührt. Dann wird zum Schluß der Niederschlag mit heißem Wasser aufgerührt und wieder absitzen gelassen, worauf man das überstehende Wasser abfiltriert. Dies wird 2–3mal wiederholt und dann erst der Niederschlag sorgfältig, eventuell mit Gummiwischer, aufs Filter gebracht. Nach mehrmaligem Nachwaschen mit heißem Wasser wird der Niederschlag ausgewaschen und samt dem Filter in einem vorher gewogenen Platintiegel noch feucht verbrannt. Zu diesem Zwecke erhitzt man den zu $\frac{2}{3}$ bedeckten Tiegel im Gebläse ganz allmählich mit schwacher Flamme (keine leuchtende Flamme!), bis das Filter langsam verkohlt ist. Sobald sich das Filter entzündet, entfernt man den Brenner und stellt ihn erst wieder dann unter, wenn die Filterflamme erloschen ist. Entzündet sich bei stärkerem Erhitzen das verkohlte Filter, bzw. seine Verbrennungsgase an der Tiegelmündung nicht mehr, dann erhitzt man den unbedeckten Tiegel mit vollem Gebläse, bis der Niederschlag völlig weiß geworden ist. Nach Erkalten im Exsikkator wird gewogen, Glühen und Wägung werden bis zur Gewichtskonstanz fortgesetzt.

Berechnung: Die gewogene Niederschlagsmenge besteht aus CaO .

b) Magnesium: Das Filtrat nebst dem zum Auswaschen des Calciumniederschlags verbrauchten Wasser werden in ein Becherglas von entsprechendem Inhalt übergespült (bzw. schon vorher in ein solches filtriert). Nun wird auf dem Wasserbad auf etwa 200–250 cm^3 eingedampft und nach dem Erkalten mit Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion ver-

setzt. Nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Ammoniumcitratlösung wird mit Natriumphosphat in reichlicher Menge (etwa 50 cm^3) ausgefällt. Da vorher im Urin reichlich Phosphate vorhanden sind, so tritt häufig schon beim Ammoniakzusatz eine Trübung durch Tripelphosphat auf; nach dem Zusatz des Phosphats entsteht allmählich ein Niederschlag, dessen quantitatives Ausfallen und Absetzen man durch Erwärmen auf dem Wasserbad befördert. Nach 12 Stunden filtriert man durch ein aschefreies Filter ab und bringt den an der Glaswand ziemlich fest haftenden Niederschlag mit Hilfe des Gummiwischers aufs Filter. Mit 2·5% iger Ammoniaklösung wird mehrmals nachgewaschen und das Filter in der Wärme getrocknet. Dann verascht man in der gleichen Weise, wie oben beim Calcium (a) beschrieben, vorsichtig das Filter und glüht im Gebläse, bis der Niederschlag grauweiß geworden ist. Nach kurzem Erkalten fügt man 2 Tropfen 20% ige Salpetersäure hinzu, erhitzt erst schwach und dann mit voller Stärke, bis der Niederschlag schön weiß ist. Nun wird nach Erkalten im Exsikkator gewogen und dies ebenfalls bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

Berechnung: 222·72 Teile Magnesiumpyrophosphat, aus dem der Niederschlag besteht, entsprechen 80·72 Teilen MgO.

O. Schwefelbestimmung.

1. Bestimmung der Gesamtschwefelsäure nach Mohr-Beuttenmüller.

Prinzip: Die Ätherschwefelsäuren werden durch Kochen mit Salzsäure gespalten und nun die gesamte Schwefelsäure mit Chlorbaryum gefällt, das entstandene Baryumsulfat gewogen und daraus die Schwefelsäure berechnet.

Erforderliche Reagenzien:

1. 5% ige Chlorbaryumlösung.
2. Salzsäure, spec. Gew. 1·125 = 25% ige HCl.
3. Alkohol.
4. Äther.
5. Schwefelsäure.

Ausführung: 100 cm^3 filtrierter Harn (bei Eiweißgehalt vorher enteiweißen!) werden in ein Becherglas von etwa 500 cm^3 Inhalt gemessen und 10 cm^3 Salzsäure hinzugefügt. Dann wird die Flüssigkeit auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt und etwa 20 Minuten schwach kochend erhalten. Nun wird mit Wasser auf das 2—3fache verdünnt und nochmals zum Sieden erhitzt. Dann werden etwa 20 cm^3 Chlorbaryumlösung, die

vorher in einem Reagensglas erhitzt worden waren, allmählich zugefügt. Der entstehende Niederschlag wird durch Erhitzen auf dem Wasserbad (oder auch durch 24stündiges Stehenlassen) völlig zum Absitzen gebracht. Nun wird durch ein aschefreies Filter von etwa 10 cm Durchmesser filtriert; das Filtrat muß völlig klar sein. Der Niederschlag wird mit heißem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat mit Silbernitrat keine Trübung mehr gibt. Hierauf wird mit absolutem Alkohol 2mal und dann mit Äther einmal gewaschen. Das getrocknete Filter kommt darauf in den vorher gewogenen Platintiegel, in dem zunächst durch gelindes Glühen das Filter verascht und dann stark geglüht wird, bis der Inhalt völlig weiß geworden ist; eventuell ist der Zusatz von je einem Tropfen 25 % iger Salpetersäure und 20 % iger Schwefelsäure hierzu erforderlich, um etwa entstandenes BaS wieder in BaSO₄ überzuführen. Nach dem Glühen wird der Tiegel etwa 1/2 Stunde in den Exsikkator gestellt und dann wieder gewogen; dies wird bis zur Gewichtskonstanz wiederholt. Das erhaltene Gewicht minus dem Gewicht des leeren Tiegels ergibt das Baryumsulfat.

Berechnung: 233 Teile Baryumsulfat entsprechen 98 Teilen H₂SO₄ oder 96 Teilen SO₄ oder 80 Teilen SO₃.

Fehlerquellen: Zu niedrige Werte erhält man durch ungenügende Spaltung der Ätherschwefelsäuren (zu kurzes Kochen), durch ungenügenden Chlorbaryumzusatz (das Filtrat muß mit Schwefelsäure einen Niederschlag geben), durch Verluste beim Filtrieren (der Niederschlag war mangelhaft sedimentiert; Niederschlag nicht fein genug). Zu große Werte erhält man, wenn ein großer Überschuß an Baryumchlorid auf einmal zugesetzt wurde, weil dieses sich dann aus dem Niederschlag nicht mehr völlig auswaschen läßt.

2. Ätherschwefelsäurebestimmung nach Salkowski¹⁾.

Prinzip: Die Sulfatschwefelsäure wird aus dem Urin entfernt durch Ausfällen mit einer Barytmischung, im Filtrat die Ätherschwefelsäuren mit Salzsäure gespalten und mit Baryumchlorid ausgefällt.

Erforderliche Reagenzien:

Barytmischung: 2 Volumina kalt gesättigte Baryumhydratlösung und ein Volumen kalt gesättigte Chlorbaryumlösung werden gemischt.

Ferner die unter 1. aufgeführten Lösungen.

Ausführung: 100 cm³ Harn werden in einem Becherglas von 300 cm³ mit 100 cm³ Barytmischung versetzt und nach 10 Minuten

¹⁾ Salkowski, Virchows Arch. 1880, Bd. 79, S. 551–554.

durch ein trockenes Faltenfilter filtriert; falls das Filtrat nicht völlig klar abläuft, muß es noch einmal auf das Filter zurückgebracht werden. Vom Filtrat mißt man 100 cm^3 ab und verfährt damit wie unter 1. angegeben.

Berechnung wie bei 1., unter Berücksichtigung der Verdünnung.

Bei Anwesenheit größerer Mengen von Glykuronsäure bilden sich nach Kossel¹⁾ schwer lösliche Barytsalze, so daß man zu kleine Mengen Ätherschwefelsäure erhalten würde. In diesem Falle müßte man zurückgreifen auf die etwas langwierigere

3. Bestimmung der Ätherschwefelsäure nach Baumann²⁾.

Prinzip: In dem mit Essigsäure angesäuerten Urin werden die Alkalisulfate mit Chlorbaryum ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wird mit Salzsäure erhitzt, wobei die nunmehr gespaltenen Ätherschwefelsäuren ebenfalls als Barytsalz ausfallen.

Erforderliche Reagenzien:

10% ige Essigsäure und die unter 1. genannten Lösungen.

Ausführung: 50 cm^3 Harn werden in einem 300 cm^3 Becherglas mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit 10 cm^3 Essigsäure und einem Überschuß von Chlorbaryumlösung (20 cm^3 genügen meist) versetzt. Der entstandene Niederschlag wird durch Erwärmen auf dem Wasserbad zum Absitzen gebracht und abfiltriert (wozu häufig immer erneutes Zurückgießen auf das Filter nötig ist) und mit heißem Wasser nachgewaschen. Niederschlag und Filter werden dann mit Alkohol und Äther getrocknet, im Platintiegel verascht, geglüht und gewogen. Aus dem Gewicht ergibt sich die Menge der als Alkalisulfat im Harn vorhandenen Schwefelsäure (Sulfatschwefelsäure).

Das Filtrat mitsamt dem Waschwasser werden nun nach 1. behandelt. Meist erhält man dann beim Abfiltrieren des Barytniederschlags braune, harzige Substanzen auf dem Filter, die sich mit Alkohol größtenteils entfernen lassen. Der 2. Barytniederschlag ergibt die Menge der im Urin enthaltenen gepaarten Schwefelsäuren.

Berechnung wie unter 1.

4. Die Bestimmung der Sulfatschwefelsäure

geschieht bei der Baumannschen Methode direkt oder als Differenz zwischen Gesamtschwefel und Ätherschwefelsäure.

¹⁾ Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1882/83, Bd. 7, S. 292–296. — ²⁾ Baumann, ebenda 1877, Bd. 1, S. 70.

5. Bestimmung des neutralen Schwefels im Harn nach Modrakowski.

Prinzip: Schwefelhaltige Substanzen lassen sich leicht mit Natrium-superoxyd oxydieren.

Erforderliche Reagenzien:

1. Natriumsuperoxyd.
2. Salzsäure.
3. 10 % ige Chlorbaryumlösung.
4. 1 % ige Phenolphthaleinlösung.
5. Alkohol.
6. Silbernitratlösung.

Ausführung: In eine entsprechend große Nickelschale gibt man 1–2 g Natriumsuperoxyd und läßt 50 cm³ Harn aus der Pipette langsam dazu tropfen. Dabei findet nur mäßiges Schäumen und kein Verspritzen statt. Man dampft zur Syrupkonsistenz ein, versetzt vorsichtig mit 1–2 g Peroxyd, erwärmt auf der Flamme erst schwach, dann stärker, noch einmal 1–3 g zusetzend. Nach dem Erkalten (das Gemenge muß ganz flüssig geworden sein) setzt man Wasser hinzu und erhitzt, um alles zu lösen. Nun filtriert man durch ein Baryumfilter, spült mit heißem Wasser nach und säuert das Filtrat gegen Phenolphthalein mit Salzsäure an. Mit etwas Alkohol kocht man auf und setzt, vorsichtig ein Aufschäumen vermeidend, etwa 10–20 cm³ Chlorbaryumlösung hinzu. Die Fällung läßt man 24 Stunden absitzen, filtriert dann durch ein kleines aschefreies Filter, das man einige Stunden gefaltet im Trichter in Wasser gestellt hatte. Man wäscht so lange mit heißem Wasser nach, bis das Spülwasser mit Silbernitrat keine Chlorreaktion mehr gibt. Nun wird mit Alkohol und Äther getrocknet, im Platintiegel das Filter verascht, der Inhalt geglüht und gewogen, Glühen und Wägen bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

Berechnung: Das Resultat ist Gesamtschwefel, man rechnet ihn mit 0.343 als SO₃ um und zieht davon die als SO₃ umgerechnete Gesamtschwefelsäure ab, der Rest ist Neutralschwefel als SO₃.

II. Stoffwechseluntersuchungen des Blutes.

A. Enteiweißung des Vollblutes, Plasmas oder Serums.

Für fast alle Untersuchungen des Blutes ist eine voraufgehende Enteiweißung erforderlich. Wir besprechen daher zunächst die wichtigsten dieser Enteiweißungsmethoden, einzelne besondere Methoden sind bei den Bestimmungen einzelner Blutbestandteile abgehandelt.

1. Enteiweißung des Blutserums nach Hohlweg und Meyer¹⁾.

50 cm³ Blutserum werden mit 50 cm³ einer Mischung von gleichen Teilen 1 % iger Essigsäure und 5 % iger Monokaliumphosphatlösung versetzt, darauf mit Wasser auf 300 cm³ aufgefüllt und noch 400 cm³ einer gesättigten Kochsalzlösung hinzugefügt. Die Mischung wird in einer Porzellanschale auf einem Asbestnetz zum Sieden gebracht, der entstehende Niederschlag absitzen gelassen und filtriert. Das Filtrat zeigt erst bei Einengung auf $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{20}$ eine positive Biuretreaktion.

2. Enteiweißung des Blutserums mit Uranylacetat.

25—50 cm³ Serum werden 4fach mit Wasser verdünnt (25 cm³ zu 100 cm³, 50 cm³ zu 200 cm³) und mit der gleichen Menge 1½ % iger Uranylacetatlösung versetzt, wie die ursprüngliche Serummenge beträgt (25—50 cm³). Nach gutem Umschütteln wird sofort filtriert.

3. Enteiweißung des Blutserums oder Vollblutes nach Moog²⁾.

Vollblut, Serum oder Plasma werden in einem Becherglas mit der gleichen Menge 20 % iger Trichloressigsäure versetzt, gut durchgerührt und filtriert. Falls das Filtrat nicht ganz wasserklar ist, wird es noch ein- oder mehrmals auf das Filter zurückgegossen. Diese Enteiweißung ist die einfachste und für viele Untersuchungen (Rest-N, Harnstoff, Indican) zweckmäßigste.

¹⁾ Hohlweg u. Meyer, Hofmeisters Beitr. 1908, Bd. 11. — ²⁾ s. Ambard u. Hallion, C. R. soc. de Biol. 1912, S. 435.

4. Enteiweißung des Gesamtblutes nach Rolly und Oppermann¹⁾.

Erforderliche Reagenzien:

1. Eisenlösung = Ferrum oxydatum dialysatum liquidum 10 % duplex (Merck).
2. Mononatriumphosphatlösung = 1 Teil Mononatriumphosphat + 4 Teile Wasser.

Ausführung:

In ein hohes, etwa 150 cm³ fassendes Becherglas werden mit einer Auslaufpipette 10 cm³ Blut gemessen. Nachdem die Pipette völlig ausgelaufen ist, wird sie mit Wasser in ein 50-cm³-Meßkölbchen nachgespült und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. In das Becherglas werden nun zu dem Blute aus einer genau geachten Bürette 25 cm³ Eisenlösung unter stetigem, emsigen Umrühren mit einem mit Gummischer versehenen Glasstab tropfenweise zugesetzt und gleichmäßig verrührt. Darauf werden aus dem Meßkölbchen die 50 cm³ Nachspülflüssigkeit schußweise unter dauerndem Rühren zugesetzt und die völlig gleichmäßige Mischung kurze Zeit stehen gelassen. Sodann werden aus der Bürette weitere 15 cm³ Eisenlösung wie oben zugesetzt und darauf aus einer zweiten Bürette tropfenweise unter ständigem Rühren soviel Mononatriumphosphatlösung zugelassen, bis das Gemenge breiig wird. Nun wird etwa 1 Minute stehen gelassen und dann wieder gerührt, bis das Gemenge wieder eine ganz gleichmäßige Konsistenz zeigt. Alsdann werden wieder tropfenweise und unter stetigem Rühren nochmals 10 cm³ Eisenlösung und darauf soviel Phosphatlösung zugesetzt, wie an einer Gesamtmenge von 10 cm³ Phosphatlösung noch fehlen. Die Mischung bleibt nun bedeckt oder im Eisschrank 10 Minuten stehen, dann saugt man sie mit einem Buchnerschen Filter ab. Wenn der Rückstand fast trocken ist, stellt man, um die Flüssigkeit völlig aus ihm auszupressen, eine in das Buchnersche Filter gerade hineinpassende Petri-Schale auf den Filterrückstand, und auf diese ein Gewicht, und fährt darauf noch einige Zeit mit dem Absaugen fort.

B. Blutzuckerbestimmungen.

1. Makroblutzuckerbestimmung nach Bertrand.

Prinzip: Das durch Reduktion Fehlingscher Lösung gebildete Kupferoxydul reduziert einen gewissen Teil einer Ferrisalzlösung zu

¹⁾ Rolly u. Oppermann, Bioch. Zeitschr. 1912, Bd. 48.

Ferrosalz. Die Menge des letzteren wird durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt.

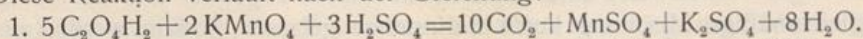
Erforderliche Reagenzien:

1. 40 g reinstes lufttrockenes Kupfersulfat werden zu 1 l mit Wasser gelöst.

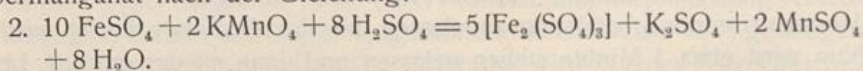
2. 200 g reines Seignettesalz (weinsaures Kaliumnatrium) und 150 g festes Natriumhydroxyd (in Stangen) werden im Meßkolben in destilliertem Wasser zu 1 l gelöst.

3. 50 g reines Ferrisulfat werden im Meßcylinder in etwa 200 cm³ Wasser gelöst. Andererseits werden 200 cm³ konzentrierte Schwefelsäure (spec. Gew. 1.84) mit etwa 400 cm³ Wasser verdünnt, indem man die Schwefelsäure sehr langsam in das Wasser einfließen läßt. Die abgekühlte Mischung wird zu der Lösung des Eisensalzes zugegeben und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

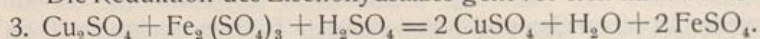
4. 5 g Kaliumpermanganat werden mit destilliertem Wasser zu 1 l aufgefüllt. Der Titer dieser Lösung wird gegen Oxalsäure eingestellt. Diese Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Andererseits erfolgt die Oxydation des Eisenoxydulsalzes mit Kaliumpermanganat nach der Gleichung:



Die Reduktion des Eisenoxysalzes geht vor sich nach der Gleichung:



Aus diesen Gleichungen ergibt sich, daß ein Molekül Kaliumpermanganat in Reaktion tritt mit 5 Molekülen Eisenoxydulsalz (2) oder mit 5/2 Molekülen Oxalsäure (1). Andererseits entspricht 1 Molekül Eisenoxysalz 1 Molekül Kupfersulfat.

Da die Kaliumpermanganatlösungen ihren Titer ändern, verzichtet man darauf, Normallösungen herzustellen, sondern bereitet annähernde Normallösungen, deren Titer (d. h. Oxydationsvermögen) vor der Verwendung mit Oxalsäure festgestellt wird. Die Oxalsäure wird durch Kaliumpermanganat zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. Zur Herstellung der n/10 Oxalsäure wiegt man 6.3024 reinste krystallisierte Oxalsäure pro analysi (Kahlbaum) genau ab und füllt mit Wasser auf 1 l auf. Diese Lösung ist 8 Monate haltbar. Zur Titerstellung der Kaliumpermanganatlösung verdünnt man 5 cm³ konzentrierte Schwefelsäure mit 10 cm³ Wasser, mißt 30 cm³ der n/10 Oxalsäure ab, fügt dazu 10 cm³ dieser verdünnten Schwefelsäure und füllt mit Wasser von 70° auf 200 cm³ auf. Die Mischung wird mit der Kaliumpermanganatlösung bis zur bleibenden Rosafärbung titriert. Es seien beispielsweise für diese

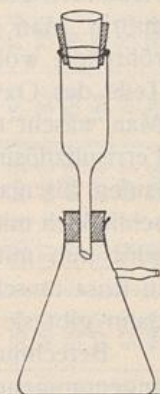
Titration 20 cm^3 Kaliumpermanganat verbraucht worden. Da nun $n/10$ Oxalsäure in 10 l nur $\frac{1}{2}$ Molekül Oxalsäure enthält, anderseits 1 Molekül Oxalsäure 2 Molekülen Fe-Oxydul, bzw. Cu entspricht, so wäre 1 cm^3 der $n/10$ Oxalsäure äquivalent einer Lösung von Eisenoxydul- oder Kupfersalz, die in 10 l 1 Molekül dieser Salze enthielte, d. h. 1 Molekül Oxalsäure entspräche 0.0056 Fe , bzw. 0.00636 Cu . Da nun zur Oxydation von 30 cm^3 $n/10$ Oxalsäure 20 cm^3 Kaliumpermanganat verbraucht wurden, so entspricht 1 cm^3 der Kaliumpermanganatlösung 1.5 cm^3 der $n/10$ Oxalsäure $= 0.0084\text{ Fe} = 0.00954\text{ Cu}$.

5. Reagenzien zur Enteiweißung s. unter II., A., 4.

Ausführung: 10 cm^3 durch Zusatz von Kaliumoxalat (etwa 5—10 Tropfen einer 20% igen Lösung) ungerinnbar gemachten Blutes werden nach der unter II., A. 4, angegebenen Methode enteiweißt. Das Filtrat und je 20 cm^3 der Kupfersulfat- und Seignettesalzlösung werden mit der Pipette in einen Erlenmeyer-Kolben von etwa 150 cm^3 gegeben, dieser auf einem Drahtnetz zum Sieden erhitzt und genau 3 Minuten gelinde gekocht. Man läßt nun das gebildete Kupferoxydul absitzen (je länger, desto besser), die überstehende Flüssigkeit muß noch blau gefärbt sein, sonst ist die Bestimmung mit einer geringeren Blutmenge zu wiederholen.

Anderseits hat man ein Saugfläschchen mit einem mit Asbest armierten Filterröhrchen versehen (s. Abb. 53); es genügt eine 2 mm dicke Schicht ganz feinen Asbests. Man gießt nun unter gelindem Saugen mit der Wasserstrahlpumpe die über dem Niederschlag befindliche blaue Flüssigkeit durch das Asbestfilter und wäscht den im Kolben zurückgebliebenen Niederschlag noch 2mal mit destilliertem Wasser nach, läßt schnell absitzen und gießt die überstehende Flüssigkeit wieder durch das Asbestfilter. Wenn etwas Kupferoxydul, das ja vom Asbest zurückgehalten wird, beim Dekantieren mitgeht, schadet es nichts; es ist aber darauf zu achten, daß das möglichst wenig geschieht. Um eine Reoxydation des Kupferoxyduls durch den Sauerstoff der Luft zu verhindern, ist peinlichst darauf zu achten, daß sowohl der Kupferoxydulniederschlag in dem Kolben als auch der etwa auf das Asbest gekommene, stets von Flüssigkeit bedeckt ist und also mit der Luft nicht in Berührung kommt. Um den Niederschlag beim Dekantieren möglichst wenig aufzurühren, empfiehlt es sich, den Kolben nach dem Kochen in ein Schälchen mit Eis in schräger Stellung über dem Filterröhrchen anzubringen, so daß er beim Dekantieren in der gleichen Richtung nur noch etwas mehr geneigt zu werden braucht. Bei einiger

Abb. 53.



Übung gelingt es so leicht, zu erreichen, daß erstens kein Niederschlag auf das Asbestfilter kommt, und daß der Niederschlag zweitens nicht mit der Luft kommuniziert, sondern entweder von der blauen Flüssigkeit oder dem zum Nachspülen verwendeten, schnell wieder hinzugesetzten Wasser bedeckt ist.

Die in der Saugflasche filtrierte klare Lösung wird nun fortgegossen, die Flasche selbst mit Wasser gut ausgespült und das Filtrierröhrchen wieder daraufgesetzt. Zu dem Kupferoxydulniederschlag in dem Erlenmeyer-Kolben setzt man etwa 20 cm^3 der Ferrisulfatlösung, wobei eine Reduktion des Ferrisulfats, kenntlich durch die grüne Färbung der Lösung, auftritt. Man gießt diese Lösung nun an einem Glasstabe in das Filtrierröhrchen, wobei auch die etwa schon beim Dekantieren hineingelangten Teile des Oxyduls gelöst werden, und saugt langsam in die Flasche. Man wäscht den Erlenmeyer-Kolben mit einigen Kubikzentimetern der Ferrisulfatlösung nach und läßt diese ebenfalls durch das Filter hindurchlaufen, bis man annehmen kann, daß alles Oxydul gelöst ist, und wäscht schließlich mit etwas Wasser nach. Die in der Flasche befindliche Lösung wird nun mit Kaliumpermanganat titriert, bis die grüne Farbe gerade in Rosa umschlägt. Es ist wichtig, bei der Methode schnell zu arbeiten dann gibt sie vorzügliche Resultate.

Berechnung: Nach den obigen Ausführungen entsprach 1 cm^3 der angenommenen Kaliumpermanganatlösung 9.54 mg Kupfer. Zur Titration seien von dieser Lösung (jede neu angefertigte Permanganatlösung muß nach der oben angegebenen Methode eingestellt und berechnet werden) 7.3 cm^3 verbraucht worden, die $9.54 \text{ mal } 7.3 = 69.9\text{ mg}$ Kupfer entsprechen würden. Aus der nebenstehenden Tabelle nach Allihn ergibt sich, daß 69 mg Kupfer 35.3 mg Zucker entsprechen, 70 mg Kupfer aber 35.8 mg Zucker; durch Interpolation ergibt sich der gesuchte Zuckerwert unserer Lösung zu 35.75 mg . Durch Multiplikation mit 10 errechnet sich der prozentuale Zuckergehalt des untersuchten Blutes in Milligrammen.

Die Bertrandsche Methode gibt die besten Werte, bei einer Zuckerkonzentration von höchstens 0.5% ; stärkere Lösungen, die ja beim Blut nur selten angetroffen werden, sind daher entsprechend zu verdünnen, bzw. die halbe Menge Blut zu verarbeiten.

2. Mikrozuckerbestimmung nach Bang¹⁾.

Prinzip: Das Kupferoxyd wird durch den Traubenzucker zu Kupferoxydul reduziert, dieses durch Jodsäure in saurer Lösung reoxydiert.

¹⁾ Bang, Bioch. Zeitschr., Bd. 87 u. 92.

Tabelle zur Ermittlung des Traubenzuckers aus dem Gewicht des Kupfers nach Allihn.

Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker	Kupfer	Traubenzucker
mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
10	6.1	31	16.5	52	26.9	73	37.3	94	47.9	115	58.6	136	69.3	157	80.1	178	91.1						
11	6.6	32	17.0	53	27.4	74	37.9	95	48.4	116	59.1	137	69.8	158	80.7	179	91.6						
12	7.1	33	17.5	54	27.9	75	38.3	96	48.9	117	59.6	138	70.3	159	81.1	180	92.1						
13	7.6	34	18.0	55	28.4	76	38.8	97	49.4	118	60.1	139	70.8	160	81.7	181	92.6						
14	8.1	35	18.5	56	28.8	77	39.3	98	49.9	119	60.6	140	71.3	161	82.2	182	93.1						
15	8.5	36	18.9	57	29.3	78	39.8	99	50.4	120	61.1	141	71.8	162	82.7	183	93.7						
16	9.0	37	19.4	58	29.8	79	40.3	100	50.9	121	61.6	142	72.3	163	83.3	184	94.1						
17	9.5	38	19.9	59	30.3	80	40.8	101	51.4	122	62.1	143	72.9	164	83.8	185	94.7						
18	10.0	39	20.4	60	30.8	81	41.3	102	51.9	123	62.6	144	73.4	165	84.3	186	95.2						
19	10.5	40	20.9	61	31.3	82	41.8	103	52.4	124	63.1	145	73.9	166	84.8	187	95.7						
20	11.0	41	21.4	62	31.8	83	42.3	104	52.9	125	63.7	146	74.4	167	85.3	188	96.3						
21	11.5	42	21.9	63	32.3	84	42.8	105	53.5	126	64.2	147	74.9	168	85.9	189	96.8						
22	12.0	43	22.4	64	32.8	85	43.4	106	54.0	127	64.7	148	75.5	169	86.4	190	97.3						
23	12.5	44	22.9	65	33.3	86	43.9	107	54.5	128	65.2	149	76.0	170	86.9	191	97.8						
24	13.0	45	23.4	66	33.8	87	44.4	108	55.0	129	65.7	150	76.5	171	87.4	192	98.4						
25	13.5	46	23.9	67	34.3	88	44.9	109	55.5	130	66.2	151	77.0	172	87.9	193	98.9						
26	14.0	47	24.4	68	34.8	89	45.4	110	56.0	131	66.7	152	77.5	173	88.5	194	99.4						
27	14.5	48	24.9	69	35.3	90	45.9	111	56.5	132	67.2	153	78.1	174	89.0	195	100.0						
28	15.0	49	25.4	70	35.8	91	46.4	112	57.0	133	67.7	154	78.6	175	89.5	196	100.5						
29	15.5	50	25.9	71	36.3	92	46.9	113	57.5	134	68.2	155	79.1	176	90.0	197	101.0						
30	16.0	51	26.4	72	36.8	93	47.4	114	58.0	135	68.8	156	79.6	177	90.5	198	101.5						

Die verbrauchte Jodatmenge wird aus der Differenz der angewandten und der mit Thiosulfat zurücktitrierten Jodmenge berechnet.

Erforderliche Reagenzien:

1. Salzlösung. KCl puriss. pro analysi (Kahlbaum) 400·0, Uranylacetat puriss. 3·0, 25 % ige Salzsäure 1·5 cm^3 , Kupfersulfat 0·8, Aq. dest. ad 2000 cm^3 . Alle diese Reagenzien müssen darauf untersucht werden, ob sie frei von reduzierenden Substanzen sind. Verunreinigungen haben wir besonders häufig beim Chlorkalium beobachtet¹⁾, das man eventuell mehrfach umkrystallisieren muß, um es hiervon zu befreien.

2. Jodsäurelösung. Kal. jodat. puriss. 0·3567, 20 % ige Schwefelsäure 10 cm^3 , Aqu. dest. ad 1000 cm^3 .

3. Alkalilösung. Kaliumcarbonat 75·0, Seignettesalz 20·0, Aq. dest. ad 1000 cm^3 .

4. 20 % ige Schwefelsäure.

5. 5 % ige Jodkalilösung.

6. Stärkelösung. Stärke 1·0, KCl puriss. 2·0, Aq. dest. ad 1000 cm^3 .

7. n/10 Thiosulfatlösung. 24·8 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ werden lufttrocken abgewogen und in 1-l-Meßkolben überführt. Etwas über 1 l destilliertes Wasser wird $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht, der Kochkolben darauf unmittelbar verschlossen, erkalten gelassen und der 1-l-Kolben damit bis zur Marke aufgefüllt, sein Inhalt in einer schwarzen Flasche aufbewahrt. 2 Monate haltbar. In jeder Woche muß der Titer der Lösung mit Kaliumbichromatlösung kontrolliert werden. Zu diesem Zweck werden 20 cm^3 n/10 Kaliumbichromatlösung abgemessen, dazu ungefähr 20 cm^3 Wasser, 10 cm^3 konzentrierte Salzsäure und 10 cm^3 10 % ige wässrige Jodkalilösung zugefügt und ungefähr auf $\frac{1}{4}$ l aufgefüllt. Man titriert nunmehr mit der in der Bürette befindlichen Thiosulfatlösung, bis die anfangs stark braun gefärbte Flüssigkeit hell geworden ist, fügt dann einige Tropfen Stärkelösung zu und titriert weiter, bis die auf den Stärkezusatz entstandene Blaufärbung eben verschwunden ist und die Lösung eine grüne Farbe angenommen hat. Beim Zufügen eines Tropfen Bichromatlösung muß jetzt Blaufärbung auftreten, sonst ist die Bestimmung zu wiederholen. bzw. nochmals 5 cm^3 Bichromatlösung zuzugeben und zurückzutitrieren. 1 cm^3 der Thiosulfatlösung muß 1 cm^3 der Jodlösung genau entsprechen, da 1 cm^3 der Kaliumbichromatlösung auch 1 cm^3 einer n/10 Jodlösung äquivalent ist. Andernfalls ist die Konzentration der Thiosulfatlösung entsprechend zu ändern. Aus der n/10 Thiosulfatlösung wird vor der Ausführung jeder Bestimmung eine n/100 Lösung hergestellt, indem man 10 cm^3 derselben genau abmißt und im Meßkolben auf 100 cm^3 auffüllt.

¹⁾ Rosenberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1922, Bd. 92.

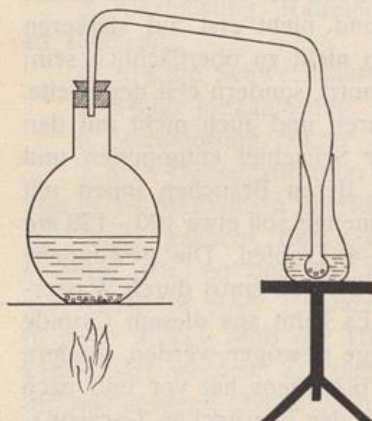
Ausführung: a) Blutentnahme. Durch einen Einstich in die Fingerbeere oder das Ohrläppchen mit dem Frankeschen Schnepfer werden einige Blutstropfen auf ein Stückchen Fließpapier entnommen. Das Fließpapier ist in der erforderlichen Größe ($16 \times 26 \text{ mm}$) käuflich, doch muß man sich ebenso wie bei den Reagenzien durch eine Leerbestimmung davon überzeugen, daß es frei von reduzierenden Substanzen ist. Andernfalls muß es einige Male in ganz schwach angesäuertem Wasser und schließlich 1–2mal in reinem Wasser ausgekocht und dann wieder getrocknet werden, bis es keine reduzierende Substanzen mehr enthält. Die Einstichstelle muß durch Abreiben mit Äther von Fett gereinigt sein, doch darf der Einstich erst erfolgen, wenn der Äther vollkommen verdunstet ist. Das Blut soll von selbst und nicht erst auf stärkeren Druck hervorquellen, der Einstich darf also nicht zu oberflächlich sein; der erste Tropfen wird am besten nicht benutzt, sondern erst der zweite. Das Filterpapier darf nicht die Haut berühren und auch nicht mit den Fingern berührt werden. Es wird aus der Schachtel entnommen und gehalten mit einer sauberen Hornpinzette, deren Branchen innen mit Messing belegt sind. Die entnommene Blutmenge soll etwa 100–120 mg betragen, diese Menge entspricht etwa 3–4 Tropfen. Die gewonnene Blutmenge muß sofort schnell gewogen werden, da sonst durch Wasserverdunstung ihr Gewicht verändert wird. Es kann aus diesem Grunde nicht mit der gewöhnlichen chemischen Wage gewogen werden, sondern die Gewichtsbestimmung des Filtrierpapierblättchens hat vor und nach der Beschickung mit Blut zu erfolgen mittels der Bangschen Torsionswaage, die eine auf 1 mg genaue Bestimmung innerhalb weniger Sekunden erlaubt. Aus der Differenz beider Bestimmungen ergibt sich das Gewicht der entnommenen Blutmenge.

Um die Anschaffung einer Torsionswaage zu vermeiden, ist empfohlen worden, $0,1 \text{ cm}^3$ Blut mittels einer kleinen geachten Pipette zu entnehmen und deren Inhalt quantitativ auf ein Filtrierpapierblättchen auszustreichen. Wir sind der Ansicht, daß durch diese Maßnahmen in die an sich diffizile Methodik des „Bang“ noch weitere Fehlerquellen hineingetragen werden, und empfehlen vielmehr, wenn man die Benutzung der Torsionswaage umgehen will, an Stelle der Bangschen die Hagedornsche Mikromethode (II., A., 3.) zu verwenden.

b) Enteiweißung und Reduktionsbestimmung. Die mit Blut getränkten Filtrierpapierscheibchen werden nach ihrer Wägung etwa 5 Minuten lang trocknen gelassen und dann in je ein kurzes, weites Reagenzglas gebracht, in denen sie, ohne anzustoßen, Platz finden. Zu dem getrockneten Papier werden $6,5 \text{ cm}^3$ der Salzlösung gegeben, die man vorsichtig vom Rand aus zufließen läßt, um nicht Blutteilchen von dem

Papier damit abzuspülen. In der Salzlösung bleiben die Papierscheiben mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde; in dieser Zeit wird der Zucker aus dem Blut extrahiert, während das Eiweiß koaguliert und bei sorgfältiger Technik an dem Papier haften bleibt, so daß die Lösung nicht durch Eiweißflocken getrübt wird. Nach mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde (und höchstens 3–4 Stunden) wird die Salzlösung in einen Erlenmeyer-Kolben von 125 cm^3 gegossen und das Reagensglas mit 6.5 cm^3 Salzlösung nochmals nachgespült, die ebenfalls in den Kolben gebracht werden. Sollte sich doch etwas Eiweiß von dem Papier abgelöst haben, so muß das Übergießen

Abb. 54.



in den Erlenmeyer-Kolben durch ein möglichst kleines Filter erfolgen, doch können durch das Filtrieren leicht Substanzverluste entstehen, so daß es besser durch vorsichtiges Arbeiten zu vermeiden ist. In den Erlenmeyer-Kolben kommen weiterhin genau mit einer Vollpipette abgemessene 2 cm^3 Jodsäurelösung, sowie 2 cm^3 Alkalilösung. Nun wird der Kolbeninhalt 4 Minuten zum Sieden erhitzt, u. zw. unter Abschluß der Luft, deren Sauerstoff sonst das durch den Traubenzucker reduzierte Kupferoxydul teilweise wieder reoxydieren könnte. Zu diesem Zwecke wird ein Kolben von etwa 1–2 l Inhalt zur Hälfte mit destilliertem Wasser und einigen Siedesteinchen gefüllt und zum Sieden erhitzt. Der ausströmende Wasserdampf wird in die Lösung übergeleitet durch ein 2mal rechtwinklig gebogenes Glasrohr, das durch einen durchbohrten Korken in den Kochkolben hineinragt, während es auf der anderen Seite eine bauchige Verdickung in der Art einer Pipette aufweist, die gerade auf die Öffnung des Erlenmeyer-Kolbens zu stehen kommt und diesen dadurch abschließt (s. Abb. 54). Der unterste Teil des Überleitungsrohres, der so lang sein muß, daß er eben den Boden des Erlenmeyer-Kolbens berührt, weist eine kolbige Verdickung mit mehreren kleinen Löchern auf, durch die der Wasserdampf entweicht. Das Wasser im Kochkolben wird nun durch eine darunter gestellte nicht zu starke Flamme zum Sieden gebracht, worauf der in die Lösung strömende Wasserdampf diese im Verlauf etwa einer $\frac{1}{2}$ Minute ebenfalls ins Sieden versetzt, außerdem aber den oberen Kolbenraum mit Wasserdampf füllt, während die vorher dort befindliche Luft durch den kleinen Zwischenraum zwischen Kolbenhals und Bauchung des Überleitungsrohres ent-

weicht, so daß die Oberfläche der Lösung dauernd mit Wasserdampf, aber nicht mit Luft bedeckt ist. Nachdem das Sieden der Lösung etwas weniger als 4 Minuten andauert, werden mit einer Pipette 2 cm^3 20% ige Schwefelsäure abgemessen, und nachdem volle 4 Minuten seit Beginn des Siedens verflossen sind, der auf einem beweglichen Stativ stehende Erlenmeyer-Kolben etwas gesenkt und die Schwefelsäure schnell hineingegeben. In der sauren Lösung reduziert das Kupferoxydul die Jodsäure, indem es sich selbst wieder oxydiert, und von diesem Moment an ist die Reoxydationsgefahr durch den Luftsauerstoff beseitigt. Man läßt nun erkalten, gibt etwa 25 cm^3 Wasser, 1 cm^3 5% ige Jodkalilösung und 2 Tropfen Stärkelösung hinzu, wodurch sich die Lösung blau färbt, und titriert aus einer Mikrobürette nach Bang mit $n/100$ Thiosulfatlösung, bis die Lösung farblos ist und beim Stehen 5 Minuten lang bleibt. Tritt vor 5 Minuten erneut eine Blaufärbung auf, so muß noch $\frac{1}{2}$ –1 Tropfen Thiosulfat zugegeben werden. Mit der Ausführung der Titration kann man beliebig lange warten, z. B. bei Serienuntersuchungen, bis alle Einzelbestimmungen gekocht sind, so daß die Titration aller Bestimmungen zum Schluß hintereinander erfolgen kann.

Vor Ausführung einer Bestimmung oder einer Serie von Bestimmungen muß jedesmal eine oder mehrere Leerbestimmungen ohne Blut, aber sonst wie oben beschrieben, ausgeführt werden, um das jodbindende Vermögen der angewandten Reagenzien festzustellen. Es ist oben darauf hingewiesen worden, daß die Reagenzien leicht Verunreinigungen enthalten, die die Bestimmungen fehlerhaft beeinflussen können, aber auch reinste Reagenzien weisen ein gewisses jodbindendes Vermögen auf, das jedoch im allgemeinen bei den angewandten Mengen nur 0.03 cm^3 Thiosulfatlösung entspricht, keinesfalls aber mehr als höchstens 0.15 cm^3 betragen soll.

Bei sehr hohen Blutzuckerwerten über 0.5%, wie sie ja selten, aber zuweilen doch, z. B. beim Coma, vorkommen, darf nur 50 mg Blut, oder besser nur die Hälfte der zuckerhaltigen Salzlösung zur Ausführung benutzt werden.

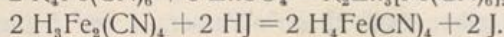
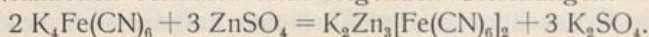
Berechnung: Die bei der Bestimmung verbrauchte Thiosulfatlösung wird von der bei dem Leerversuch verbrauchten abgezogen; die Differenz dividiert durch 2.8 (2.8 cm^3 $n/100$ Thiosulfatlösung entspricht 1 mg Zucker) ergibt den Traubenzucker in Milligrammen in der verwandten Blutmenge.

Die Bangsche Methode erfordert peinlichst korrektes Arbeiten und große Übung, liefert aber, wenn diese Vorbedingungen erfüllt sind, sehr genaue und zuverlässige Werte.

3. Mikromethode nach Hagedorn-Jensen¹⁾.

Prinzip: Das mit einer Mikropipette entnommene Blut wird durch Kochen in Zinkhydroxydaufschwemmung enteiweißt, das eiweißfreie Filtrat in der Wärme mit einer Ferricyanidlösung behandelt, das dabei durch Reduktion gebildete Ferrocyanid ausgefällt und das überschüssige Ferricyanid jodometrisch bestimmt.

Die Reaktionen verlaufen nach folgenden Gleichungen:



Erforderliche Reagenzien:

1. n/10 Natronlauge.
2. 0.45 % ige Zinksulfatlösung.

Beide Lösungen sind alle 8 Tage frisch aus n/1 Lauge, bzw. 45 % ige Zinksulfatlösung herzustellen.

3. Ferricyanidlösung. 1.65 g Kaliumferricyanid puriss. pro analysi, 16.6 g Natriumcarbonat, wasserfrei, Aq. dest. ad 1 l. Vor Licht geschützt aufbewahren!

4. Kaliumjodidzinksulfatnatriumchloridlösung. (Kaliumjodid 5.0, Zinksulfat puriss. eisenfrei 10.0, Natriumchlorid 50.0, Aq. dest. ad 200 cm³). Von der Lösung kann eine größere Menge ohne den Kaliumjodidzusatz vorrätig gehalten werden, während das nicht absolut haltbare Kaliumjodid nach und nach in kleineren Mengen der Lösung zugesetzt werden muß. Ist freies Jod in der Lösung vorhanden, kann es auch durch Filtrieren durch ganz dickes Filterpapier fast vollständig entfernt werden. Kleinere Fehlermengen werden durch Blindversuch ermittelt.

5. Essigsäurelösung. Eisessig (eisenfrei, Kahlbaum) 3.0, Aq. ad 100 cm³.

6. Stärkelösung. 1 g Stärke in 100 cm³ wässriger gesättigter Kochsalzlösung.

7. Thiosulfatlösung. 0.7 g Natriumthiosulfat, Aq. dest. ad 500 cm³. Der Titer dieser Lösung muß vor der jedesmaligen Bestimmung durch Titration mit folgender Kaliumjodatlösung bestimmt werden: 0.3566 g (exactissime) wasserfreies Kaliumjodat, Aq. ad 2000 cm³.

Ausführung: a) Enteiweißung. In ein Glas von etwa 15 mm Weite und 150 mm Länge werden 1 cm³ n/10 Natronlauge und 5 cm³ 0.45 % ige Zinksulfatlösung gemischt. Mit einer genau graduierten Capillarpipette werden (wie bei der Bangschen Methodik, nur daß hier, um das Aufsaugen von Luft zu vermeiden, größere Blutstropfen, also unter Umständen tiefere Einstiche erforderlich sind) 0.1 cm³ Blut aufgesogen, dieses

¹⁾ Hagedorn-Jensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 135.

in die gelatinöse Zinkhydroxydaufschwemmung ausgeblasen und die Pipette noch 2mal mit der gleichen Lösung ausgespült und jedesmal wieder in das Glas entleert. Bis zur weiteren Verarbeitung kann man jetzt bis zu einigen Stunden stehen lassen. Das Glas wird nun vollständig im siedenden Wasserbad 3 Minuten erhitzt, wobei das Eiweiß in groben grauen Ballen ausfällt. Dann wird durch einen kleinen Trichter von 3 bis 4 cm Durchmesser in ein gleiches Glas filtriert, Trichter und Filter mit Hilfe der Pipette mit je 3 cm³ Wasser 2mal nachgewaschen.

Tabelle für Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen

cm³ n/200 Thiosulfat = mg Glykose.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.0	0.385	0.382	0.379	0.376	0.373	0.370	0.367	0.364	0.361	0.358
0.1	0.355	0.352	0.350	0.348	0.345	0.343	0.341	0.338	0.336	0.333
0.2	0.331	0.329	0.327	0.325	0.323	0.321	0.318	0.316	0.314	0.312
0.3	0.310	0.308	0.306	0.304	0.302	0.300	0.298	0.296	0.294	0.292
0.4	0.290	0.288	0.286	0.284	0.282	0.280	0.278	0.276	0.274	0.272
0.5	0.270	0.268	0.266	0.264	0.262	0.260	0.259	0.257	0.255	0.253
0.6	0.251	0.249	0.247	0.245	0.243	0.241	0.240	0.238	0.236	0.234
0.7	0.232	0.230	0.228	0.226	0.224	0.222	0.221	0.219	0.217	0.215
0.8	0.213	0.211	0.209	0.208	0.206	0.204	0.202	0.200	0.199	0.197
0.9	0.195	0.193	0.191	0.190	0.188	0.186	0.184	0.182	0.181	0.179
1.0	0.177	0.175	0.173	0.172	0.170	0.168	0.166	0.164	0.163	0.161
1.1	0.159	0.157	0.155	0.154	0.152	0.150	0.148	0.146	0.145	0.143
1.2	0.141	0.139	0.138	0.136	0.134	0.132	0.131	0.129	0.127	0.125
1.3	0.124	0.122	0.120	0.119	0.117	0.115	0.113	0.111	0.110	0.108
1.4	0.106	0.104	0.102	0.101	0.099	0.097	0.095	0.093	0.092	0.090
1.5	0.088	0.086	0.084	0.083	0.081	0.079	0.077	0.075	0.074	0.072
1.6	0.070	0.068	0.066	0.065	0.063	0.061	0.059	0.057	0.056	0.054
1.7	0.052	0.050	0.048	0.047	0.045	0.043	0.041	0.039	0.038	0.036
1.8	0.034	0.032	0.031	0.029	0.027	0.025	0.024	0.022	0.020	0.019
1.9	0.017	0.015	0.014	0.012	0.010	0.008	0.007	0.005	0.003	0.002

b) Reduktionsbestimmung. Es werden 2 cm³ der alkalischen Ferri-cyanidlösung zugesetzt und das Glas 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach erfolgter Abkühlung muß innerhalb 6 Stunden titriert werden. Zu diesem Zweck werden genau 3 cm³ Kaliumjodidlösung zugefügt, gemischt, dann mit 2 cm³ der Essigsäure angesäuert und das ausgeschiedene Jod unter Zusatz von 2 Tropfen Stärkelösung mit der Thiosulfatlösung aus einer Mikrobürette bis zur Farblosigkeit titriert. Der der verbrauchten Menge Thiosulfatlösung entsprechende Zuckerwert ergibt sich aus obenstehender Tabelle, von ihm ist derjenige Zuckerwert abzuziehen, den der jedesmal vorher auszuführende Leer-versuch ergeben hat.

Die Hagedornsche Methode hat vor der Bangschen den Vorzug, daß ihre Technik viel einfacher ist, daß sie keine Torsionswaage benötigt, und daß sie durch Verwendung der Eisenlösung an Stelle des Kupfersulfats die Gefahr der Reoxydation durch den Luftsauerstoff beseitigt. Ihr Nachteil liegt darin, daß größere Blutstropfen benötigt werden, so daß der Kranke bei Reihenuntersuchungen durch die häufigen tieferen Einstiche unter Umständen mehr belastigt wird als bei der Bangschen Methode.

C. Bestimmungen der Blutacidose.

1. Bestimmung der Gesamtacetonkörper, der β -Oxybuttersäure, der Acetessigsäure + Aceton nach van Slyke, im Serum oder Vollblut.

Prinzip s. I., B., d).

Erforderliche Reagenzien: s. ebenda.

Ausführung: 8 cm^3 Serum oder Blut werden in einen 200- cm^3 -Meßkolben pipettiert und mit 50 cm^3 Wasser und 15 cm^3 Quecksilbersulfatlösung versetzt. Nach einigen Minuten, während welcher umgeschüttelt wurde, wird bis zur Marke aufgefüllt. Nach 15 Minuten wird durch ein trockenes Faltenfilter filtriert und so oft auf dieses zurückgegossen, bis das Filtrat klar durchläuft. Mit 125 cm^3 des Filtrats wird die Bestimmung der Gesamtacetonkörper in genau derselben Weise ausgeführt, wie für 25 cm^3 Urinfiltrat + 100 cm^3 Wasser bei I., B., d) beschrieben ist. Um Aceton + Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure getrennt zu bestimmen, werden aus den 125- cm^3 -Filtrat zuerst Aceton + Acetessigsäure entsprechend dem beim Urin angewandten Verfahren, ohne Zusatz von Chromat gefällt und der Niederschlag auf dem Gooch-Tiegel zwecks Wägung gesammelt. Die Titration empfiehlt sich bei den geringen Mengen nicht. 160 cm^3 des noch nicht mit Waschwasser verdünnten Filtrats werden nach Zusatz von 5 cm^3 Bichromatlösung anderthalb Stunden unter dem Rückflußkühler gekocht, wobei der β -Oxybuttersäure entsprechende Niederschlag ausfällt. Die hieraus gefundene Menge β -Oxybuttersäure ist mit $\frac{170}{160}$ zu multiplizieren. Zur Berechnung dienen folgende Faktoren:

Ausgeführte Bestimmung	1 g Niederschlag entspricht
Gesamtacetonkörper	12.8% Aceton
β -Oxybuttersäure	13.2% Aceton = 23.7% β -Oxybuttersäure
Aceton + Acetessigsäure	10.0% Aceton

2. Bestimmung der Acetonkörper nach Engfeldt-Pincussen¹⁾.

Prinzip: Aus dem enteiweißten Blut wird getrennt einerseits präformiertes Aceton und Aceton aus Acetessigsäure, anderseits Aceton aus β -Oxybuttersäure destilliert und das Aceton jodometrisch bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. Bleiessig.
2. 1%ige Alaunlösung.
3. Verdünnte Schwefelsäure. 25 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure, mit Wasser auf 100 cm^3 verdünnt.
4. Chromatschwefelsäure. 2 g Kaliumbichromat, 20 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure, Wasser ad 100 cm^3 .
5. Konzentrierte Natronlauge.
6. n/100 Jodlösung.
7. n/100 Thiosulfatlösung.
8. 1%ige Stärkelösung.

Ausführung: 25 cm^3 unter Zusatz von Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtes Blut werden in einem Meßkolben von 100 cm^3 mit ungefähr 75 cm^3 Wasser verdünnt, 5 cm^3 Bleiessig und 10 cm^3 Alaunlösung zugegeben und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Man läßt etwa $\frac{1}{2}$ Stunde stehen und filtriert sodann durch ein dichtes Faltenfilter, so daß die Lösung vollständig klar erscheint. Zur Destillation des Filtrates dient folgender einfache Apparat: Ein kleiner Destillierkolben von etwa 200 cm^3 ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen armiert, durch dessen eines Loch ein bis fast auf den Boden reichendes Glasrohr gesteckt ist, das oben in einen weiten Trichter ausgeweitet ist. Durch die andere Öffnung führt ein zweites Glasrohr, dessen Mündung kurz unter dem Stopfen liegt. Es ist 2mal rechtwinklig umgebogen und besitzt in der Mitte eine kugelförmige Erweiterung, um etwaige Spritzer bei der Destillation unschädlich zu machen. Als Auffanggefäß dient ein Standgefäß oder ein Jenaer Reagensglas, das ebenfalls mit einem doppelt durchbohrten Stopfen armiert ist. Durch die eine Öffnung desselben wird ein bis auf den Boden reichendes Rohr gesteckt, das mit dem absteigenden Schenkel des zum Destillierkolben führenden Glasrohres durch ein gut schließendes Stück Gummischlauch Glas an Glas verbunden ist. Durch die andere Bohrung führt ein zweites rechtwinklig gebogenes Rohr, an welches an der andern Seite ein zur Wasserstrahlpumpe führender Schlauch aufgesetzt ist. Der Destillierkolben taucht in ein Becherglas oder Blechgefäß mit Wasser ein, das durch eine kleine Flamme auf 45° erwärmt wird.

¹⁾ Pincussen, Mikromethodik. Leipzig 1921, Georg Thieme.

80 cm^3 des Filtrats werden in den Destillationskolben gebracht und 2 cm^3 Schwefelsäure hinzugefügt. Das Auffanggefäß wird beschickt mit genau 2 cm^3 Jodlösung und 2 cm^3 konzentrierter Natronlauge. Nachdem die Verbindungen fest hergestellt sind, wird unter direktem Erhitzen ein starker Luftstrom durchgesaugt, der während einer Dauer von 15 Minuten unterhalten wird, und das gesamte Aceton (präformiertes und das acetessigsäure) aus der Lösung mitreißt. Nach Beendigung wird das Auffanggefäß abgenommen, gut verschlossen und 15 Minuten stehen gelassen, um die Jodoformbildung vollständig vor sich gehen zu lassen. Nun wird eine neue Vorlage an den Apparat angeschlossen, die genau in der gleichen Weise mit Jodlösung und Natronlauge beschickt wird. In das auf seinem Platz gebliebene Destillationsgefäß werden durch den Trichter 10 cm^3 Bichromatschwefelsäure zugesetzt und nunmehr unter Erhitzen weitere 25 Minuten lang destilliert. Das Auffanggefäß wird wieder 15 Minuten stehen gelassen.

Zur Titration werden in jedes Auffanggefäß 2 cm^3 verdünnter Schwefelsäure gefügt, so daß die Lösung deutlich sauer und durch Jodausscheidung bräunlich gefärbt ist. Man fügt 1 Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert mit Thiosulfatlösung bis zur Farblosigkeit (über diese Titration und die Einstellung der Thiosulfatlösung vgl. die Bangsche Blutzuckerbestimmung, II., B., 2.).

Zur Bestimmung der Gesamtacetonkörper erfolgt die Vorbereitung in der gleichen Weise. Die Destillation erfolgt nach dem sofortigen Zusatz von Bichromatschwefelsäure.

Berechnung: Die Menge des Acetons berechnet sich daraus, daß 1 cm^3 n/100 Jodlösung 0.1024 mg Gesamtaceton entspricht. Da 2 cm^3 Blut benutzt waren, so wird die Menge Aceton in 1 cm^3 durch Multiplikation der verbrauchten Kubikzentimeter Jodlösung mit 0.0512 in Milligrammen erhalten. Das 2. Destillat enthält eine Ausbeute von 69.2 % Aceton aus β -Oxybuttersäure, so daß 1 cm^3 n/100 Jodlösung 0.25 mg β -Oxybuttersäure entspricht. Für die Berechnung der Gesamtacetonkörper ist, wenn man die Acetonkörper als Acetessigsäure ausdrücken will, die Menge des verbrauchten Jods mit 0.22 mg zu multiplizieren.

Beispiel: Es seien vorgelegt für die Acetonbestimmung 2.0 cm^3 Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 1.2 cm^3 Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung demnach 0.8 cm^3 . Das in der verbrauchten Blutmenge (2 cm^3) enthaltene Aceton würde sich also zu $0.8 \text{ mal } 0.1024 = 0.0819 \text{ mg}$ Aceton berechnen, in 100 cm^3 also 4.1 mg . Zur Bestimmung des Acetons aus β -Oxybuttersäure seien ebenfalls 2 cm^3 Jodlösung vorgelegt und 0.8 cm^3 Thiosulfatlösung verbraucht worden. Die Differenz $1.2 \text{ mal } 0.25 \text{ mg} = 0.3 \text{ mg}$ gibt die β -Oxybuttersäuremenge in 2 cm^3 Blut,

$0.3 \text{ mal } 50 = 15 \text{ mg}$ die in 100 cm^3 . Für die Gesamtacetonkörperbestimmung seien 2 cm^3 Jodlösung vorgelegt und 0.4 cm^3 Thiosulfatlösung verbraucht. Die Differenz $= 1.6 \text{ mal } 0.22 = 0.352$ ergibt die Gesamtacetonkörper, als Acetessigsäure ausgedrückt, in 2 cm^3 Blut, also 17.6 mg in 100 cm^3 Blut.

3. Mikromethode nach Lublin¹⁾.

Prinzip: Nach Enteiweißung des Blutes mit Wolframsäure und Schwefelsäure werden die Acetonkörper überdestilliert und jodometrisch bestimmt.

Reagenzien:

1. 10 % ige Natriumwolframatlösung.
2. $\frac{2}{3} \text{ n}$ Schwefelsäure.

Ferner die für die Acetonkörperbestimmung im Harn nach Lublin (s. I., B., e) erforderlichen Lösungen.

Ausführung: Nach leichter Stauung im Fingergrundgelenk werden aus der Fingerbeere 2 geaichete Capillarpipetten von je 0.1 cm^3 Inhalt mit Blut vollgesogen. Nach Abstreichen des an der Außenseite haftenden Blutes wird ihr Inhalt in ein Zentrifugenspitzenfläschchen gespritzt, in dem sich genau mit einer 1-cm^3 -Stangenpipette abgemessene 0.8 cm^3 Wasser befinden und zur völligen Entleerung der Capillarpipetten die in dem Zentrifugenglas befindliche Flüssigkeit noch einmal aufgesaugt und wieder ausgespritzt. Hierauf gibt man aus einer 1-cm^3 -Stangenpipette 0.3 cm^3 $\frac{2}{3} \text{ n}$ Schwefelsäure hinzu, schüttelt durch, und darauf 0.3 cm^3 Natriumwolframatlösung, und schüttelt wiederum gut durch. Eiweiß + Hämoglobin fallen als schokoladenfarbener Niederschlag aus. Sodann wird, um Acetonverluste zu vermeiden, das Zentrifugenglas mit einem flachen Korkstopfen verschlossen und auf einer elektrischen Zentrifuge $1\frac{1}{2}$ Minuten lang scharf zentrifugiert. Die über dem Sediment stehende, eiweißfreie, klare Flüssigkeit gießt man in ein trockenes Reagensglas ab und überführt aus diesem mit einer Stangenpipette einen aliquoten Teil, in der Regel 0.75 cm^3 , in einen Mikrokjeldahl-Kolben von 50 cm^3 . Dazu gibt man unter Nachspülen des Reagensglases 25 cm^3 Wasser, 1 cm^3 10 % ige Essigsäure, eine Spur Talkum und setzt den Kolben an das Destillationsrohr des bei der Acetonkörperbestimmungsmethode im Harn nach Lublin (s. I., B., e) beschriebenen Destillationsapparates. Als Vorlage dienen 2 Erlenmeyer-Kolben (A und B) von 100 cm^3 , die je mit 15 cm^3 Wasser + 5 cm^3 $\text{n}/200$ Jodlösung + 2 cm^3 25 % iger Natronlauge gefüllt sind. Es wird mit möglichst niedrigem, gegen Luftzug geschütztem Bunsenbrenner destilliert. In den ersten

¹⁾ Lublin, Bioch. Zeitschr. 1922, Bd. 133.

10 Minuten wird das präformierte und das aus Acetessigsäure gebildete Aceton überdestilliert. Alsdann wird bei unverändert stehbleibendem Bunsenbrenner die Vorlage *A* durch die Vorlage *B* ersetzt, worauf 20 cm³ Kaliumbichromatschwefelsäure langsam zugetropft werden. Nach 10 Minuten wird die zweite Destillation unterbrochen, indem man zuerst die Vorlage senkt, das Destillationsrohr kurz abspült und dann erst den Brenner zur Seite stellt. Nachdem man die Vorlage *B* fortgenommen hat, läßt man noch den kleinen Rest Bichromatschwefelsäure, der sich eventuell im Scheidetrichter befindet, in den Kolben hineinlaufen und spült mit etwas Wasser nach, damit während der Destillation *A* der nächsten Analyse kein Tropfen Chromatlösung in den Kolben tropfen kann.

Beide Vorlagen werden nach Hinzufügen von 2 cm³ 25 % iger Schwefelsäure und 3 Tropfen 1 % iger Stärkelösung mit n/200 Natriumthiosulphatlösung (Mikrobürette) aus blau nach farblos titriert.

Berechnung: Die verbrauchten Kubikzentimeter Jod der Vorlage *A* ergeben, multipliziert mit 0.0483, den Acetongehalt in Milligrammen, die für die Vorlage *B* verbrauchten Kubikzentimeter Jodlösung ergeben, mit 0.125 multipliziert, den β -Oxybuttersäuregehalt in Milligrammen in der zur Bestimmung angewandten Blutmenge. Diese berechnet sich aus der ursprünglich verwandten Blutmenge (0.2 cm³), dividiert durch das Gesamtflüssigkeitsvolumen vor dem Zentrifugieren (0.2 + 0.8 + 0.6 = 1.6) und multipliziert mit dem nach dem Zentrifugieren abpipettierten Flüssigkeitsvolumen, meist 0.75 cm³. Die Ausbeute an Ausgangsmaterial für die Bestimmung beträgt also bei diesen Flüssigkeitsmengen $\frac{0.2 \cdot 0.75}{1.6} = 0.09 \text{ cm}^3$.

Die gefundene Aceton-(bzw. β -Oxybuttersäure-)Menge, multipliziert mit 100 und dividiert durch 0.09, ergibt also den prozentualen Aceton-(bzw. β -Oxybuttersäure-)Gehalt des Blutes.

4. Quantitativer Nachweis der Blutacidose durch Bestimmung der Alkalireserve des Blutes nach van Slyke¹⁾.

Prinzip: Bei Bildung pathologischer Säuren im Blut wird die CO₂ des Blutes teilweise durch diese verdrängt und so eine Säuerung des Blutes zunächst verhindert. Die CO₂-Kapazität des Serums ist daher ein guter Indikator dafür, wie weit diese Verdrängung der CO₂ durch pathologische Säuren schon erfolgt, oder wie groß noch die „Alkalireserve“ des Blutes ist. Nach der van Slykeschen Methode wird nun die gesamte Kohlensäure des CO₂ gesättigten Plasmas durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzt und volumetrisch bestimmt; aus dem er-

¹⁾ van Slyke, Journ. of biol. Chem., Bd. 30.

haltenen, am Apparat ablesbaren Volumen wird der Wert in der Tabelle unter Berücksichtigung von Luftdruck und Temperatur abgelesen.

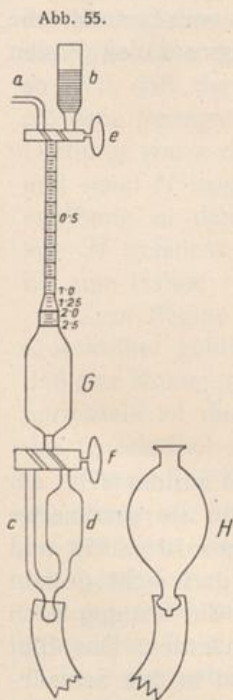
Erforderliche Reagenzien:

1. 1 % ige CO_2 -freie Ammoniaklösung. Um eine absolut kohlenensäurefreie Ammoniaklösung zu gewinnen, wird die Ammoniaklösung mit Barythydrat versetzt, vom ausgefallenen Carbonat abfiltriert und ein eventueller Überschuß an Baryum mit Ammonsulfat ausgefällt.

2. 10 % ige Schwefelsäure.

3. Caprylalkohol.

Apparatur: 1. Der von van Slyke angegebene Apparat¹⁾ ist folgendermaßen konstruiert (s. Abb. 55). Der große Pipettenraum *G* setzt sich nach oben hin in einen stark verengten Teil und weiterhin in einen fast capillaren Teil fort. Der Gesamtraum von einer am unteren Teil des Pipettenraums angebrachten Marke bis zum obersten Ende umfaßt 50 cm^3 . Von diesen umfaßt der capillare Teil 1 cm^3 , der in 50 Teile zu je 0.02 cm^3 geteilt ist, so daß 0.01 cm^3 abgelesen werden kann. Der darunter liegende Teil hat Marken in größeren Abständen, die letzte (2.5 cm^3) am Ausgang des Mittelteils. Das obere Ende des genau geteilten Meßrohres kommuniziert durch einen doppelt durchbohrten Hahn *e* entweder mit einem capillaren, zur Außenluft führenden Rohr *a* oder mit einem Aufsatz *b*, der ebenfalls seine Verbindung durch ein Capillarrohr erhält. Der untere Teil des Pipettenraums kommuniziert durch einen Hahn *f* entweder mit einem kleineren Vorratsraum *d* oder mit einem Rohr *c*; *c* und *d* vereinigen sich an ihrem unteren Ende zu einem Ansatzstück. Von diesem führt ein



dickwandiger Schlauch von etwas größerer Länge, als die gesamte Höhe des Apparates beträgt (Druckschlauch), zum Reservoir *H*.

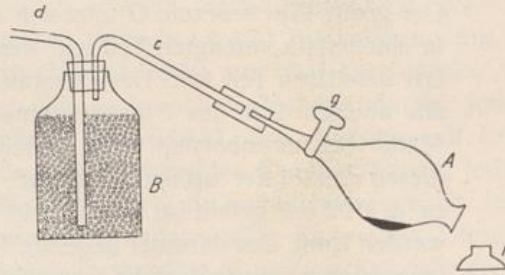
Der ganze Apparat muß aus starkem Glas gefertigt sein; er wird in einem festen Stativ eingeklemmt. Um den Hals von *H* wird ein starker Draht mit Schlinge befestigt, mit dem man dieses Gefäß in verschiedenen Höhen fixieren kann. Die Schlitze der Hähne müssen tadellos funktionieren, so daß nur eine geringe Spur Fett notwendig ist, um einen absolut luftdichten Verschuß herzustellen. Infolge des starken Druckes durch die Quecksilberfüllung müssen die Hähne durch Gummibänder,

¹⁾ Der Apparat kann bezogen werden von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin NW.

oder besser noch durch Spiralen so fixiert sein, daß sie bei einer Druckerhöhung nicht herausgeschleudert werden können.

2. Man stellt sich selbst eine kleine Apparatur her, wie sie unten abgebildet ist (Abb. 56). Ein Scheidetrichter *A* ist an seinem unteren Ende durch einen kurzen Schlauch verbunden mit einer durch einen Gummistopfen verschlossenen Flasche *B*, die mit Glasperlen gefüllt ist. Durch die eine Bohrung des Gummistopfens geht ein Verbindungsrohr *c* zum Scheidetrichter, das dicht unter dem Stopfen endet, durch die andere Bohrung ein zweites Glasrohr *d*, das bis fast auf den Boden der Flasche reicht.

Abb. 56.



Ausführung: *a)* Blutentnahme. Man läßt das direkt aus der Vene, am besten mit einer 10-cm³-Spritze, entnommene Blut in ein graduiertes Zentrifugenglas laufen, das 0.05 feingepulvertes Kaliumoxalat enthält, und schüttelt einige Male vorsichtig durch. Die Vene darf nicht gestaut sein, oder, wenn sich dies nicht umgehen läßt, ist die Stauung nach dem Einstich vor dem Absaugen des Blutes zu entfernen. Das Blut wird sofort zentrifugiert, 3 cm³ Plasma abgehoben und in den Scheidetrichter der oben beschriebenen Apparatur gebracht. Nach gewöhnlicher Einatmung atmet man nun, um das Plasma mit Kohlensäure zu sättigen, durch das Rohr *d* tief aus. Die Ausatemungsluft passiert die Flasche *B*, wo sich die Feuchtigkeit an den Glaskugeln niederschlägt, während die übrige kohlensäurehaltige Luft in den Scheidetrichter *A* gelangt, wo sie die darin enthaltene Luft vertreibt. Unmittelbar nach dem Ausatmen setzt man den Stöpsel *f* auf den Scheidetrichter auf, und schließt ihn auf der anderen Seite durch den Hahn *g* ab. Nun entfernt man ihn vom Schlauche und sättigt durch langsames Drehen des Scheidetrichters das Plasma vollständig mit der CO₂-haltigen Alveolarluft. Diese Prozedur wird 2mal wiederholt.

b) Bestimmung der Kohlensäure. Vor Beginn des Versuchs muß der van Slykesche Apparat ganz mit Quecksilber gefüllt werden, ein-

schließlich der Schlauchverbindung und des unteren Drittels von *H*. Bei neuen Apparaten ist außerdem eine Kalibrierung erforderlich, indem man einen bestimmten Teil des graduierten Rohres mit destilliertem Wasser füllt und nach Herausdrücken des Wassers durch das Kapillarrohr *a* mit Hilfe der Wage feststellt, ob das Gewicht dem angegebenen Volumen entspricht. Zur Prüfung auf Dichtheit stelle man den Hahn *e* so, daß der Apparat mit der äußeren Luft kommuniziert und den Hahn *f* auf Kommunikation von *G* mit dem unteren Teil. Man hebt nun *H*, das man zu ungefähr 3 Viertel mit Quecksilber gefüllt hat, langsam so weit, daß der ganze Apparat mit Quecksilber gefüllt ist und noch ein ganz geringer Teil über dem Hahn *e* steht. Dann schließt man durch Drehung von *e* den graduierten Teil vollständig von der Außenluft ab und senkt *H* langsam so tief, wie der Schlauch reicht. Bei der Wiedererhebung zu dem früheren Niveau muß sich die infolge des Senkens von *H* gefallene Quecksilbersäule unter leichtem Anschlagen wieder bis zum Hahn *e* einstellen.

Zum Beginn jedes Versuches geht man von dem vollkommen mit Quecksilber gefüllten Apparat aus, wobei der Hahn *e* so stehen muß, daß eine Kommunikation des graduierten Rohres mit dem Ansatzstück *b* hergestellt ist und durch entsprechende Stellung des Niveaugefäßes *H* das Quecksilber die Kapillare am unteren Ende von *b* ganz füllt.

Durch Einfüllen von Ammoniaklösung in das Teil *b* entfernt man aus diesem alle Säurespuren. Man pipettiert das Ammoniak wieder heraus bis auf einen kleinen Rest und unterschichtet diesen mit einer Pipette mit 1 cm^3 des mit Kohlensäure gesättigten Plasmas. Bei gleicher Hahnstellung senkt man nun langsam *H* so tief, daß das Plasma in das graduierte Rohr hineingezogen wird. Sobald das letzte Plasma den Hahn *e* passiert hat, wird dieser geschlossen, so daß das Rohr keine Verbindung mehr mit der Außenluft hat. Man gibt dann in *b* zunächst 0.4 cm^3 destilliertes Wasser, läßt dieses unter Senkung von *H* durch Öffnung von *e* zum Plasma fließen, indem man darauf achtet, daß noch etwas Flüssigkeit in *b* stehen bleibt, wiederholt diese Manipulation mit 0.5 cm^3 destilliertem Wasser und gibt endlich unter gleicher Vorsichtsmaßregel 0.5 cm^3 10% ige Schwefelsäure und 1 Tropfen Caprylalkohol dazu. Die Flüssigkeit muß genau den Raum vom oberen Ende des kalibrierten Rohres bis zur Marke 2.5 einnehmen, widrigenfalls ist noch etwas Wasser nachzusaugen. Man führt nun langsam *H* ganz tief, wodurch die ganze Flüssigkeit in den Raum *G* hineingesaugt wird und das Quecksilber nur bis zum Hahn *f* steht. Man schließt nun auch den Hahn *f*, so daß die ganze Flüssigkeit zwischen den Hähnen *e* und *f* eingeschlossen ist. Durch ungefähr 15maliges Umdrehen des aus dem

Stativ herausgenommenen Apparates wird die gesamte Kohlensäure freigemacht. Man befestigt wieder im Stativ, stellt durch Drehen von *f* die Verbindung von *G* und *d* her und läßt durch Senken von *H* die Flüssigkeit aus *G* nach *d* fließen, wobei man darauf achten muß, daß kein Gas mit herausfließt; es muß also eine ganz geringe Menge Wasser im untersten Teile von *G* bleiben. Nunmehr dreht man *f* so, daß *c* mit *G* kommuniziert und hebt *H* so weit, bis sein Niveau dem sich einstellenden Quecksilberniveau im graduierten Rohr entspricht. Unter diesen Umständen ergibt die Ablesung am graduierten Rohr, bei der selbstverständlich auch der eventuell über dem Quecksilber stehende Wasserrest mitzurechnen ist, die Menge der entwickelten Kohlensäure. Mit einem weiteren Kubikzentimeter des CO_2 -gesättigten Plasmas ist ein Kontrollversuch anzuschließen.

Berechnung: Die Berechnung der Alkalireserve (Kohlensäurekapazität) des Plasmas erfolgt nach nebenstehender Tabelle, indem man das gefundene Volumen CO_2 (V) mit dem zur Zeit der Bestimmung herrschenden Barometerdruck (B) multipliziert und durch den Normaldruck von 760 dividiert. Die so gefundene Zahl sucht man in der ersten Kolonne der Tabelle auf und findet dann in den folgenden Kolonnen die „Alkalireserve“ von 100 cm^3 des untersuchten Plasmas bei 0° für die Temperaturen von 15, 20, 25 und 30° C ; liegt die Temperatur während des Versuches zwischen den hier angegebenen Werten, so muß interpoliert werden. Die Normalwerte liegen zwischen 77 und 53 (bei Kindern zwischen 63 und 46), bei mäßiger Acidose finden sich Werte zwischen 40 und 30, bei starker Acidose unter 30.

D. Cholesterinbestimmung nach Bloor¹⁾, etwas modifiziert nach Hahn²⁾.

Prinzip: Das Gesamtcholesterin wird mit Alkohol-Äther extrahiert und nach Verdampfung des Extraktionsmittels in Chloroform aufgenommen. Der Chloroformauszug ergibt mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure eine Grünfärbung (Liebermannsche Reaktion), deren Intensität mit einer ebenso behandelten Cholesterinlösung von bekanntem Gehalt colorimetrisch verglichen oder in dem Colorimeter ohne Vergleichslösung nach Adler bestimmt wird. Zur Bestimmung der Cholesterinester werden diese mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert, in den die durch vorherigen Digitoninzusatz entstandenen Verbindungen des freien Cholesterins nicht

¹⁾ Bloor, Journ. of biol. Chem. 1916, Bd. 24, S. 227, und Bd. 27, S. 107. –

²⁾ Hahn, Zeitschr. f. klin. Med. 1921, Bd. 92, S. 395.

$V \cdot \frac{B}{760}$	100 cm ³ Plasma binden als Bicarbonat cm ³ CO ₂ (0° und 760 mm)				$V \cdot \frac{B}{760}$	100 cm ³ Plasma binden als Bicarbonat cm ³ CO ₂ (0° und 760 mm)			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0·20	9·1	9·9	10·7	11·8	0·60	47·7	48·1	48·5	48·6
0·21	10·1	10·9	11·7	12·6	0·61	48·7	49·0	49·4	49·5
0·22	11·0	11·8	12·6	13·5	0·62	49·7	50·0	50·4	50·4
0·23	12·0	12·8	13·6	14·3	0·63	50·7	51·0	51·3	51·4
0·24	13·0	13·7	14·5	15·2	0·64	51·6	51·9	52·2	52·3
0·25	13·9	14·7	15·5	16·1	0·65	52·6	52·8	53·2	53·2
0·26	14·9	15·7	16·4	17·0	0·66	53·6	53·8	54·1	54·1
0·27	15·9	16·6	17·4	18·0	0·67	54·5	54·8	55·1	55·1
0·28	16·8	17·6	18·3	18·9	0·68	55·5	55·7	56·0	56·0
0·29	17·8	18·5	19·2	19·8	0·69	56·5	56·7	57·0	56·9
0·30	18·8	19·5	20·2	20·8	0·70	57·4	57·6	57·9	57·9
0·31	19·7	20·4	21·1	21·7	0·71	58·4	58·6	58·9	58·8
0·32	20·7	21·4	22·1	22·6	0·72	59·4	59·5	59·8	59·7
0·33	21·7	22·3	23·0	23·5	0·73	60·3	60·5	60·7	60·6
0·34	22·6	23·3	24·0	24·5	0·74	61·3	61·4	61·7	61·6
0·35	23·6	24·2	24·9	25·4	0·75	62·3	62·4	62·6	62·5
0·36	24·6	25·2	25·8	26·3	0·76	63·2	63·3	63·6	63·4
0·37	25·5	26·2	26·8	27·3	0·77	64·2	64·3	64·5	64·3
0·38	26·5	27·1	27·7	28·2	0·78	65·2	65·3	65·5	65·3
0·39	27·5	28·1	28·7	29·1	0·79	66·1	66·2	66·4	66·2
0·40	28·4	29·0	29·6	30·0	0·80	67·1	67·2	67·3	67·1
0·41	29·4	30·0	30·5	31·0	0·81	68·1	68·1	68·3	68·0
0·42	30·3	30·9	31·5	31·9	0·82	69·0	69·1	69·2	69·0
0·43	31·3	31·9	32·4	32·8	0·83	70·0	70·0	70·2	69·9
0·44	32·3	32·8	33·4	33·8	0·84	71·0	71·0	71·1	70·8
0·45	33·2	33·8	34·3	34·7	0·85	71·9	72·0	72·1	71·8
0·46	34·2	34·7	35·3	35·6	0·86	72·9	72·9	73·0	72·7
0·47	35·2	35·7	36·2	36·5	0·87	73·9	73·9	74·0	73·6
0·48	36·1	36·6	37·2	37·4	0·88	74·8	74·8	74·9	74·5
0·49	37·1	37·6	38·1	38·4	0·89	75·8	75·8	75·8	75·4
0·50	38·1	38·5	39·0	39·3	0·90	76·8	76·7	76·8	76·4
0·51	39·1	39·5	40·0	40·3	0·91	77·8	77·7	77·7	77·3
0·52	40·0	40·4	40·9	41·2	0·92	78·7	78·6	78·7	78·2
0·53	41·0	41·4	41·9	42·1	0·93	79·7	79·6	79·6	79·2
0·54	42·0	42·4	42·8	43·0	0·94	80·7	80·5	80·6	80·1
0·55	42·9	43·3	43·8	43·9	0·95	81·6	81·5	81·5	81·0
0·56	43·9	44·3	44·7	44·9	0·96	82·6	82·5	82·4	82·0
0·57	44·9	45·3	45·7	45·8	0·97	83·6	83·4	83·4	82·9
0·58	45·8	46·2	46·6	46·7	0·98	84·5	84·4	84·3	83·8
0·59	46·8	47·1	47·5	47·6	0·99	85·5	85·3	85·2	84·8
0·60	47·7	48·1	48·5	48·6	1·00	86·5	86·2	86·2	85·7

übergehen. Im Extrakt wird das Cholesterin ebenfalls mit Hilfe der Liebermannschen Reaktion colorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. Alkohol-Äthermischung = 3 Teile
Alkohol + 1 Teil Äther.
2. Chloroform.
3. Essigsäureanhydrid.
4. Konzentrierte Schwefelsäure.
5. 1 % ige alkoholische Digitoninlösung.
6. Tetrachlorkohlenstoff.
7. ev. Cholesterin.

Ausführung. *a)* Bestimmung des Gesamtcholesterins. In ein 50-, bzw. 100- cm^3 -Meßkölbchen läßt man aus einer Pipette je nach der zur Verfügung stehenden Menge genau 1·5, bzw. 3 cm^3 Serum oder Blut einfließen; dann fügt man langsam unter Umschwenken des Kölbchens Alkohol-Äther hinzu (nicht umgekehrt), bis das Kölbchen zu $\frac{2}{3}$ gefüllt ist. Nun wird auf dem Wasserbade vorsichtig das in ständiger Bewegung gehaltene Kölbchen bis zum Aufkochen der Flüssigkeit erhitzt, dann abgekühlt und mit Alkohol-Äther bis zum Strich aufgefüllt. Umschütteln, Filtrieren. 10 cm^3 des Filtrats werden in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade gerade bis zur Trockenheit eingedampft; der Rückstand wird 3 mal mit kleinen Mengen Chloroform ausgekocht, wobei jedesmal bis auf 1–1½ cm^3 Volumen eingeengt wird. Die Chloroform-extrakte werden durch einen kleinen Wattebausch in einen graduierten 10- cm^3 -Meßcylinder mit eingeschliffenem Stopfen filtriert, mit etwas Chloroform nachgewaschen, bis das Volumen nach Abkühlen 5 cm^3 beträgt. Dann werden 2 cm^3 Essigsäureanhydrid und 0·1 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben; die Mischung wird durchgeschüttelt und $\frac{1}{4}$ Stunde im Dunkeln stehen gelassen. In einen zweiten 10- cm^3 -Cylinder werden genau 5 cm^3 Cholesterinlösung gegossen, die in 5 cm^3 Chloroform 0·5 mg Cholesterin enthält (Standardlösung), und ebenfalls 2 cm^3 Essigsäureanhydrid und 0·1 cm^3 Schwefelsäure hinzugefügt. Nach Ablauf von $\frac{1}{4}$ Stunde werden beide Lösungen im Colorimeter von Duboscq verglichen.

b) Bestimmung der Cholesterinester. Man gibt 20 cm^3 des Alkohol-Ätherfiltrats in ein Porzellanschälchen, fügt 1 cm^3 Digitoninlösung hinzu und dampft gerade bis zur Trockne ein. Hierauf gibt man etwa 6–8 cm^3 Tetrachlorkohlenstoff hinzu, kocht, bis das Volumen des Tetrachlorkohlenstoffs etwa 1 cm^3 beträgt, und filtriert durch ein kleines Trichterchen mit ganz kleinem Wattebausch in einen graduierten Meßcylinder von 10 cm^3 mit eingeschliffenem Stopfen. Diese Operation wiederholt

man 3 mal, bis das Volumen des filtrierten Tetrachlorkohlenstoffs, einschließlich der kleinen Mengen Tetrachlorkohlenstoff, die man schließlich zum Nachwaschen des Wattebüschchens verwendet, gerade 4 cm^3 beträgt. Dann bringt man das Volumen durch Hinzufügen von 1 cm^3 Chloroform auf 5 cm^3 und verfährt weiter wie bei a).

Anmerkung: Die Colorimetrie kann statt im Duboscq'schen Colorimeter auch im „Colorimeter ohne Vergleichsflüssigkeit“ von A. Adler¹⁾ vorgenommen werden, bei dem man die Intensität der Farbe an einer Grauleiter abliest. Die Benutzung des Instrumentes ist sehr einfach, und es hat sich uns für die laufenden klinischen Untersuchungen außerordentlich bewährt.

E. Harnsäurebestimmung nach Folin und Wu²⁾.

Prinzip: Harnsäure wird zusammen mit den Chloriden durch Silber gefällt, aus dem Niederschlag die Harnsäure durch salzsäurehaltige Kochsalzlösung herausgelöst und mit Hilfe des Folin'schen Harnsäurereagens colorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. Harnsäure-Standardlösung. $0.45-0.5\text{ g}$ Lithiumcarbonat werden in ein 300-cm^3 -Becherglas gebracht, 150 cm^3 heißes Wasser hinzugegossen, auf 60° erwärmt und umgeschüttelt, bis alles Carbonat gelöst ist. Nun wird 1 g genau abgewogene reine Harnsäure auf einen Trichter gebracht, der in einen 300-cm^3 -Meßkolben hineinragt, und mit der heißen Carbonatlösung die Harnsäure in den Kolben hineingespült. Beim Umschütteln löst sich die Harnsäure sofort. Sobald die Lösung klar ist, wird unter fließendem Wasser abgekühlt und unter Schütteln in einen Kolben von 1 l Inhalt umgegossen, hierauf ein Volumen von 400 bis 500 cm^3 aufgefüllt. Nun werden 25 cm^3 40% iger Formaldehydlösung zugefügt und nach gründlichem Schütteln zur Erzielung einer vollständigen Mischung der Flüssigkeiten mit 3 cm^3 Eisessig angesäuert. Dann wird wieder zur Entfernung der Kohlensäure geschüttelt und auf 1 l aufgefüllt. Der Inhalt des Kolbens wird nach gründlichem Umschütteln in kleinere, trockene, saubere Flaschen von $100-150\text{ cm}^3$ abgefüllt, diese gut mit Gummistopfen verschlossen und Stopfen und Flaschenhals mit Paraffin überzogen. Im Dunkeln aufbewahrt, hält sich die Lösung mindestens $\frac{1}{4}$ Jahr. Zur colorimetrischen Bestimmung wird im allgemeinen 1 cm^3 dieser Lösung, der 1 mg Harnsäure enthält, auf

¹⁾ A. Adler, Klin. Wochenschr. 1922, S. 1942. — ²⁾ Folin u. Wu, Journ. of biol. Chem. 1919, Bd. 38, S. 100, und 1922, Bd. 54, S. 153.

250 cm^3 verdünnt. Es wird zu diesem Zweck genau 1 cm^3 in einen 250- cm^3 -Meßkolben gebracht, dieser etwa zur Hälfte mit Wasser gefüllt und 10 cm^3 $\frac{2}{3}$ n Schwefelsäure hinzugefügt. Außerdem wird 1 cm^3 40 % ige Formaldehydlösung hinzugegeben, auf 250 cm^3 mit Wasser aufgefüllt und gemischt.

2. Harnsäurereagens nach Folin-Denis. 100 g Natriumwolframat werden mit 80 cm^3 85 % iger Phosphorsäure (spec. Gew. 1.70) und 750 cm^3 Wasser 3 Stunden (unter dem Abzug!) unter zeitweisem Ersatz des verdampfenden Wassers gekocht und nach dem Abkühlen auf 1 l aufgefüllt. Das Natriumwolframat muß vorher geprüft werden. Es enthält häufig eine Beimischung von Natriumcarbonat, das 0.5 % nicht übersteigen soll, d. h. 10 cm^3 einer 10 % igen Lösung dürfen nicht mehr als 0.4 cm^3 n/10 Säure zur Neutralisation gegen Phenolphthalein als Indikator brauchen. Andere Natriumwolframatpräparate zeigen keine alkalische Reaktion gegen Phenolphthalein (wohl aber gegen Lackmus). Diese sind als Harnsäurereagens ungeeignet und auch schlecht, zu 10 %, in Wasser löslich. Sie können benutzt werden, müssen aber in folgender Weise vorbereitet werden: Es werden 100 cm^3 einer 10 % igen Natriumwolframatlösung (nötigenfalls unter Erhitzen) hergestellt und nach Abkühlen 10 cm^3 der Lösung mit n/1 Natronlauge unter Phenolphthalein als Indikator bis zum Auftreten einer zarten, aber deutlichen blaßrosa Farbe titriert, die mindestens 3 Minuten bestehen bleiben muß. Zu den 10 % igen Lösungen werden die entsprechenden, zur Neutralisation erforderlichen, Mengen n/1 Salzsäure zugesetzt.

3. Lithiumsulfatlösung. 20 g pulverisiertes Lithiumsulfat werden in etwa 80 cm^3 kalten Wassers gelöst, auf 100 cm^3 aufgefüllt und von dem unbedeutenden Niederschlag abfiltriert.

4. Natriumcyanidlösung. Auf einem Papier werden 100 g Natriumcyanid abgewogen und in ein breites Becherglas gebracht. Dazu werden 670 cm^3 n/10 Natronlauge gefügt und zur Erzielung einer völligen Lösung ab und zu umgerührt. Die nach völliger Lösung leicht opaleszente Flüssigkeit wird in eine Flasche gebracht und 14 Tage aufgehoben, bevor sie benutzt wird. Um zu prüfen, ob die Cyanidlösung frei ist von Verunreinigungen, die mit dem Harnsäurereagens allein stärkere Färbungen geben, wird vor der Benutzung derselben folgende Probe angestellt: Bei Einfüllen von 5 cm^3 Wasser, 2 Tropfen Lithiumsulfat, 2 cm^3 Cyanidlösung und 1 cm^3 Harnsäurereagens muß die Lösung 2 Minuten lang farblos bleiben. Nach Erhitzen im Wasserbad für $1\frac{1}{2}$ Minuten und Abkühlen tritt meist eine geringe Färbung auf. Um festzustellen, ob diese die Harnsäurebestimmung wesentlich beeinflusst, werden die eben genannten Mengen der verschiedenen Lösungen

in 2 Meßcylinder gefüllt und zu dem einen 5 cm^3 Harnsäurestandardlösung, zu dem andern 3 cm^3 dieser Lösung + 2 cm^3 Wasser nach Erhitzen gefügt und auf ein größeres Volumen aufgefüllt. Bei der folgenden Colorimetrie muß bei tadelloser Beschaffenheit der Cyanidlösung die stärkere Lösung bei 33.5 mm Farbgleichheit ergeben, wenn die schwächere auf 20 mm eingestellt ist.

5. 10% ige Natriumwolframatlösung (vgl. unter 2.).

6. 5% ige Lösung von Silberlactat in 5% iger Milchsäure: 100 g Silberlactat werden in 700 cm^3 warmem Wasser gelöst. Zu 100 cm^3 85% iger Milchsäure werden 100 cm^3 10% ige Natronlauge hinzugefügt. Die z. T. neutralisierte Milchsäure wird unter ständigem Umrühren in die Silberlactatlösung gegossen, auf 1 l aufgefüllt und der stets sich bildende Bodensatz absitzen gelassen. Nur die überstehende klare Lösung darf benutzt werden.

7. 10% ige Kochsalzlösung in $n/10$ Salzsäure.

8. Pulverisiertes Lithiumoxalat, das eventuell leicht in folgender Weise hergestellt werden kann: Zu 50 g Lithiumcarbonat werden in einem 2-l-Becherglas 85 g Oxalsäure gefügt, dazu 1 l Wasser und gut durchgerührt. Nach Entweichen der Kohlensäure tritt vollständige Lösung ein; nun wird zur Trockne eingedampft und pulverisiert.

9. $\frac{2}{3}\text{ n}$ Schwefelsäure.

Ausführung: a) Enteiweißung. Das aus der Vene fließende Blut wird durch Zusatz von Lithiumoxalat (u. zw. etwa 1 mg pro Kubikzentimeter Blut!) ungerinnbar gemacht. 1 Volumen Blut (5 oder 10 cm^3) wird mit einer Pipette in eine mit Glasstöpsel versehene Mensur gebracht, die das 20fache dieses Volumens faßt. Mit der gleichen Pipette wird 7mal dasselbe Volumen Wasser nachpipettiert und die Pipette dadurch gleichzeitig nachgewaschen. Dann fügt man zu der Lösung ein Volumen 10% ige Wolframatlösung und mischt die klare hämolysierte Flüssigkeit gut durch. Nun gibt man ganz langsam, tropfenweise, unter ständigem Umschütteln $\frac{4}{5}$ Volumen $\frac{2}{3}\text{ n}$ Schwefelsäure hinzu, wodurch infolge Freisetzung der Wolframsäure Koagulation entsteht, läßt 20 bis 30 Minuten stehen und fügt dann tropfenweise, unter ständigem Schütteln, erst noch $\frac{1}{5}$ Volumen Schwefelsäure hinzu. Nach Aufsetzen des Stopfens wird 6–8mal durch ruckweises Schütteln der Mensur gut durchgemischt. Man bereitet ein trockenes Faltenfilter vor, das das ganze Volumen gut fassen kann, und filtriert durch dieses den ganzen Inhalt der Mensur in ein trockenes Gefäß, nachdem man zuerst mit einigen Tropfen der Mischung das Filter etwas angefeuchtet hat. Darauf werden 5 cm^3 des Filtrats in ein Zentrifugenglas pipettiert und mit einer Pipette 7 cm^3 der Silberlactatlösung hinzugefügt, 1–2 Minuten absitzen gelassen und

zentrifugiert. Die Harnsäure befindet sich nun im Niederschlag. Die überstehende Lösung wird von diesem möglichst vollständig durch Dekantieren entfernt und 1 cm^3 der Kochsalzlösung in Salzsäure hinzugefügt, mit einem dünnen Glasstäbchen gut durchgerührt, 4 cm^3 Wasser hinzugefügt, nochmals sorgfältig durchgerührt und wieder zentrifugiert.

b) Colorimetrie. Die 5 cm^3 überstehende Flüssigkeit, die nicht völlig klar zu sein braucht, und 2 cm^3 Wasser werden in einen graduierten Meßcylinder von 25 cm^3 gebracht, und 5 cm^3 der Harnsäurestandardlösung (1:250) und 2 cm^3 Wasser in einen zweiten. Zu jeder der beiden Flüssigkeiten werden dann 2–3 Tropfen Lithiumsulfatlösung und aus einer Bürette 2 cm^3 Cyanidlösung (Vorsicht! giftig!) zugefügt. Schließlich kommen in jeden Cylinder 1 cm^3 des Harnsäurereagens, dann wird umgeschüttelt und 2 Minuten stehen gelassen. Nunmehr werden beide Cylinder für 80 Sekunden in vorher vorbereitetes kochendes Wasser gestellt, dann abgekühlt, auf 25 cm^3 aufgefüllt und in der üblichen Weise colorimetriert. Wird die Standardlösung auf 20 mm eingestellt, so ergibt 20, dividiert durch die Ablesungszahl, multipliziert mit 4 den Harnsäuregehalt des Blutes in Milligrammprozenten. Bei Ablesung unter 10 oder über 40 mm muß von der Standardharnsäurelösung eine Verdünnung von 2:250, resp. 1:500 vorgenommen werden.

Zur Kritik der Harnsäurebestimmungen im Blut ist zu sagen, daß für unsere praktisch-klinischen Zwecke bisher nur colorimetrische Methoden geeignet sind. Diese haben aber anderseits den Nachteil, daß die Blaufärbung entsteht durch die Verbindung der Harnsäure (und vielleicht noch anderer Blutbestandteile) mit einer unbekannten Verunreinigung der Wolframsäure. Ferner kann bei jeder Enteiweißungsmethode ein unbekannter und keineswegs immer gleicher Teil der Harnsäure von dem Eiweißkoagulum adsorbiert und dadurch die Bestimmung mit erheblichen Fehlern belastet werden, wie u. a. kürzlich Harpuder u. Mond¹⁾ nachgewiesen haben. Alle unsere bisherigen Methoden zur Bestimmung der Blutharnsäure können daher nur als Schätzungsmethoden angesehen werden. Unter dieser Einschränkung hat sich uns die oben beschriebene Methode verhältnismäßig am besten bewährt.

F. Kochsalzbestimmung im Serum.

1. Makromethode.

10–20 cm^3 Serum werden mit 30–60 cm^3 Wasser verdünnt und mit 10–20 cm^3 Uranylacetat enteiweißt (s. II., A., 2.) und mit dem Filtrat der Kochsalzgehalt, wie beim Harn angegeben (s. I., L.), bestimmt.

¹⁾ Harpuder u. Mond, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1922, Bd. 27.

2. Mikromethode nach Bang¹⁾.

Prinzip: Das Vollblut, bzw. Serum wird durch 92%igen Alkohol enteiweißt, das Chlor durch Silbernitrat ausgefällt; bei weiterem Silbernitratzusatz bildet sich, wenn man der Lösung vorher etwas Chrom zugesetzt hatte, rotes Chromsilber, das durch seine Farbe das Ende der Reaktion anzeigt.

Erforderliche Reagenzien:

1. 92%iger Alkohol.
2. n/100 Silbernitratlösung.
3. 7%ige Kaliumchromatlösung.

Ausführung: Bei Verwendung von Vollblut wird ein Fließpapierblättchen mit 3–4 Tropfen Blut getränkt (näheres s. bei der Mikromethode der Blutzuckerbestimmung, II., B., 2.) und die Blutmenge mittelst der Torsionswaage gewogen. Soll, wie für die meisten Zwecke erforderlich, der Kochsalzgehalt des Serums bestimmt werden, so wird ein U-förmig gebogenes Kapillarröhrchen voll Blut gesaugt und durch scharfes Zentrifugieren das Serum von den Blutkörperchen getrennt; die Kapillare wird dann an der Grenzschicht von Blutkörperchen und Serum zerbrochen und das Serum in ein Bangsches Filter eingesaugt.

Die mit Blut oder Serum bedeckten Filter werden lufttrocken in genügend weite Reagensgläser getan und so viel 92%iger Alkohol darüber gefüllt, daß die Flüssigkeit 4–5 mm über dem Papier steht. Nach wenigstens 5 Stunden wird der Alkohol in ein kleines Becherglas von 30–50 cm³ Inhalt übergeführt, weitere 5 cm³ Alkohol zu dem Papier zugefügt und diese gleich darauf ebenfalls in das Becherglas gegossen.

Inzwischen hat man eine Bangsche Mikrobürette (die mit Chromsäure-Schwefelsäure-Mischung öfter von Fett gereinigt werden muß, der Glashahn darf nicht eingefettet werden!) mit n/100 Silbernitratlösung gefüllt, fügt dann mit einem Glasstabe der alkoholischen Lösung einen Tropfen 7%iger Kaliumchromatlösung zu und titriert vorsichtig mit dem Silbernitrat, indem man dauernd mit einem dünnen, etwa 2 mm starken Glasstab umrührt, bis zur eben beginnenden Rotfärbung.

Berechnung: Von den verbrauchten Kubikzentimetern Silbernitratlösung werden 0.05 (Verbrauch beim Blindversuch) abgezogen; der Rest multipliziert mit 585 ergibt den Chloridgehalt der angewandten Blutmenge, ausgedrückt in Tausendstel Milligrammen NaCl.

¹⁾ Bang, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. Wiesbaden 1916, J. F. Bergmann.

III. Stoffwechseluntersuchungen des Kotes.

Bei Stoffwechseluntersuchungen des Kotes wird für gewöhnlich eine Stuhlportion von mehreren Tagen abgegrenzt, um den Verlust verschiedener Nahrungsmittel durch den Kot der mit der Ernährung in der gleichen Zeit zugeführten Menge gegenüberstellen zu können. Um diese Abgrenzung durchzuführen, erhält die Versuchsperson morgens vor der ersten Mahlzeit 0.5 g Carmin (oder Tierkohle) und die gleiche Dosis nüchtern am Morgen desjenigen Tages, an dem die nächste Periode beginnt. Alle Stühle, vom ersten roten (bzw. schwarzen) einschließlich bis zum zweiten roten ausschließlich, werden gesammelt und in einem gemeinsamen Gefäß zur weiteren Verarbeitung aufgehoben.

A. Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehaltes.

Diese Bestimmung hat fast stets den weiteren vorauszugehen. Der Kot wird in eine genügend große, gewogene Porzellanschale getan, gewogen und unter mehrfachem Umrühren auf dem Wasserbad unter dem Abzug eingedampft. Um das Trocknen zu beschleunigen, kann man ab und zu einige Kubikzentimeter 90%igen Alkohol zufügen. Soll später eine Stickstoffbestimmung ausgeführt werden, so muß, um Ammoniakverluste zu vermeiden, vor dem Eindampfen mit 1%iger Schwefelsäure angesäuert werden. Ist der Kot lufttrocken, so wird er erneut gewogen und so die Trockensubstanz, aus der Differenz des ersten und zweiten Gewichts der Wassergehalt bestimmt. Zur weiteren Verarbeitung wird der lufttrockne Kot mit der Handmühle zu Pulver zermahlen oder im Mörser zerstoßen.

B. Bestimmung des Stickstoffgehaltes.

Von dem nach A. behandelten Kotpulver wird 1 g in einem N-freien Filter abgewogen und in diesem in den Kjeldahl-Kolben getan, Kupfer-

sulfat und 10 cm³ konzentrierte Schwefelsäure zugetan, das ganze einige Stunden zur Vermeidung zu starker Reaktionen erst stehen gelassen und dann nach Kjeldahl (s. I., E.), aber unter sehr langsamem Erhitzen, weiter verarbeitet.

C. Bestimmung des Fettes nach Schmidt¹⁾.

Prinzip: Aus dem getrockneten Kot wird das Fett mit Äther im Soxhlet-Apparat extrahiert und gewogen. Um von dieser Fettmenge die freien Fettsäure abzusondern, wird mit Natronlauge bis zur neutralen Reaktion titriert. Schließlich werden durch Kochen des Stuhles mit Salzsäurealkohol die darin noch befindlichen, als Seifen gebundenen Fettsäuren frei gemacht, ebenfalls mit Äther extrahiert und titrimetrisch als Säuren bestimmt. Man erhält so gesondert die Werte für Neutralfett, freie Fettsäure und Fettsäuren aus Seifen.

Erforderliche Reagenzien:

1. Äther.
2. Kaolin.
3. n/10 Natronlauge.
4. Alkohol-Äther ää.
5. 1% iger Salzsäurealkohol.

Ausführung: Der Kot wird ohne Schwefelsäurezusatz eingedampft, von dem trocknen Pulver 2mal 2 g abgewogen und je mit 1–2 Teelöffeln Kaolin gemischt in je eine Extraktionshülse²⁾ (Soxhlet-Patrone) gebracht. Jede Patrone wird nun in einen Cylinder des Soxhletschen Apparates gebracht und durch Nachpressen von etwas entfetteter Watte befestigt. Nachdem der Ätherrezipient dann angeschlossen ist, füllt man von oben Äther zu, bis der Rezipient etwas mehr als halb gefüllt ist und gleichzeitig in dem Cylinder noch Äther nahe der Abflußöffnung steht. Nun wird der Apparat mit Kühleraufsatz versehen und 3 Tage lang extrahiert. Der Ätherextrakt wird dann unter gutem Nachwaschen des Filters mit Äther in ein gewogenes Becherglas filtriert und der Äther durch Hineinstellen in eine Schale mit warmem Wasser abgedampft. Das zurückgebliebene Fett wird im Exsikkator getrocknet und dann gewogen. Die Gewichts-differenz ergibt die Summe des Neutralfettes und der freien Fettsäuren an.

Um die freien Fettsäuren gesondert zu bestimmen, wird das Fett in Alkoholäther gelöst, einige Tropfen Phenolphthaleinlösung hinzu-

¹⁾ Ad. Schmidt u. Straßburger, Die Faeces des Menschen. 2. Aufl. 1910, Hirschwald. — ²⁾ Zu beziehen durch Schleicher und Schüll.

getan und mit $n/10$ Natronlauge bis zur Rotfärbung titriert. 1 cm^3 $n/10$ Natronlauge entspricht 0.0284 g Stearinsäure. Durch Subtraktion der so gefundenen Menge an freien Fettsäuren von der gewogenen Fettmenge erhält man das Neutralfett allein.

Um schließlich die bereits verseiften Fettsäuren zu bestimmen, wird die Hülse in einem Becherglas mit Salzsäurealkohol übergossen und dieser auf dem Wasserbad verdampft. Die Patrone selbst wird dann im Trockenschrank bei 90° vollkommen getrocknet. Darauf wird sie nochmals in der gleichen Weise wie bei der ersten Extraktion 4 Tage mit Äther im Soxhlet extrahiert, der Ätherextrakt im Schütteltrichter 2mal mit Wasser gut durchgeschüttelt, um etwa noch vorhandene Spuren von Salzsäure daraus zu entfernen, unter Nachspülen des Filters mit Äther in ein Becherglas filtriert und mit $n/10$ Natronlauge und Phenolphthalein bis zur Rotfärbung titriert. Die Berechnung erfolgt wie bei den freien Fettsäuren.

IV. Chemische Analyse der Harnsteine.¹⁾

Man erhitzt eine Probe des fein gepulverten Steins auf dem Platinblech; verbrennt er dabei vollständig oder unter Zurücklassung einer sehr unbedeutenden Aschenmenge, so besteht er aus Harnsäure oder harnsaurem Ammon oder Cystin oder Xanthin. Verbrennt er nicht vollständig, so kann darin Harnsäure oder harnsaure Salze, phosphorsaurer Kalk, phosphorsaure Ammoniakmagnesia und oxalsaurer Kalk enthalten sein. Der weitere Gang der Analyse basiert auf dieser Unterscheidung.

A. Der Harnstein verbrennt vollständig.

Man digeriert das Pulver mit verdünnter Salzsäure (1:2) unter gelindem Erwärmen.

1. Das Pulver löst sich vollständig oder nahezu vollständig. Dann besteht der Stein aus Cystin oder Xanthin.

a) Zur Prüfung auf Cystin digeriert man eine Probe des Pulvers mit Ammoniak, filtriert, läßt den Auszug auf einem Uhrglas verdunsten und untersucht den Rückstand mikroskopisch. Cystin bildet sechsseitige Tafeln, mitunter aber auch Nadeln. Bei Erhitzen mit bleihaltiger Natronlauge (einige Kubikzentimeter Natronlauge + 2 Tropfen neutraler Bleiacetatlösung) entsteht Schwefelblei. Cystinsteine sind meist klein, von gelblicher Farbe und glatter Oberfläche.

b) Zur Prüfung auf Xanthin wird eine Probe des Pulvers in Salpetersäure gelöst und auf einem kleinen Porzellandeckel vorsichtig über kleiner Flamme zur Trockne verdampft: Es bleibt ein citronengelber Rückstand, der beim Betupfen mit Natronlauge intensiv rot wird. Bringt man einige Tropfen Wasser hinzu und erwärmt, so resultiert eine gelb gefärbte Lösung, welche bei vorsichtigem Verdampfen (im Gegensatz zur Murexidreaktion!) erneut einen roten Rückstand hinterläßt.

¹⁾ Nach Salkowski, Praktikum der physiologischen und pathologischen Chemie. Berlin, Hirschwald.

2. Das Pulver löst sich nicht vollständig. Man filtriert und wäscht den Rückstand aus.

a) Der Rückstand besteht aus Harnsäure, die durch die Murexidprobe identifiziert wird. Eine kleine Pulvermenge wird mit wenigen Tropfen Salpetersäure übergossen, durch Erwärmen gelöst und langsam unter Vermeidung zu starker Erhitzung verdampft. Es bleibt ein gelber bis roter Rückstand, der durch Befeuchten mit ganz wenig Ammoniak eine purpurrote Färbung durch Bildung von Murexid annimmt. Nunmehr setzt man etwas Natronlauge hinzu; es entsteht eine tiefblaue Farbe. Erwärmt man nun nochmals, so wird die Farbe blasser und verschwindet vor dem Eintrocknen völlig. Benetzt man den noch heißen blauen oder purpurroten Rückstand mit einigen Tropfen Wasser, so löst er sich zu einer fast farblosen Flüssigkeit. Beim Eindampfen derselben stellt sich die Reaktion nicht wieder her, weil das Murexid leicht zerstörbar ist. — Harnsäuresteine sind von wechselnder Größe, ziemlich hart, meistens rötlich-gelb oder bräunlich gefärbt.

b) Das Filtrat kann Chlorammonium enthalten. Zur Prüfung auf Ammoniak erhitzt man die Lösung mit Natriumcarbonat. Ammoniak gibt sich durch seinen Geruch, alkalische Reaktion u. s. w. zu erkennen.

B. Der Harnstein schwärzt sich, verbrennt aber nicht.

Eine geringe Schwärzung zeigen die Steine beim Erhitzen wohl stets infolge ihres Gehaltes an organischer Substanz. Eine Probe des fein gepulverten Steines wird mit verdünnter Salzsäure (1:2) unter Erwärmen digeriert. Aufbrausen bedeutet Kohlensäure.

1. Vollständige Lösung beweist Abwesenheit von Harnsäure.

2. Unvollständige Lösung. Der Rückstand kann aus Harnsäure oder eiweißartigen Substanzen (Epithelien etc.) bestehen. Die äußere Beschaffenheit gibt meist schon die Entscheidung darüber, eventuell die mikroskopische Untersuchung. Die Harnsäure ist leicht durch die Murexidprobe sicherzustellen.

In jedem Fall ist die filtrierte Lösung weiter zu untersuchen. Man reserviert einen Teil zur Untersuchung auf Ammoniak, verdünnt die Hauptmenge, macht mit Ammoniak schwach alkalisch, kühlt die Flüssigkeit ab, falls sie sich beim Ammoniakzusatz zu stark erhitzt hat, und säuert mit Essigsäure an. Dabei erhält man entweder eine im wesentlichen klare Lösung, oder diese ist weißlich getrübt, und es setzt sich allmählich ein weißer pulveriger Bodensatz ab.

a) Die gelblich-weißen Flecken, die sich in der im wesentlichen klaren Lösung befinden, bestehen aus phosphorsaurem Eisenoxyd. Die Bestätigung gibt die Auflösung der abfiltrierten und gewaschenen Flocken in Salzsäure: die Lösung färbt sich auf Zusatz von Ferrocyankalium blau.

b) Der weiße unlösliche Niederschlag ist oxalsaurer Kalk. Zur Bestätigung untersucht man mikroskopisch (Krystalle von Briefkuvertform), filtriert, wenn es die Menge zuläßt, wäscht aus, trocknet und glüht den Niederschlag auf dem Platinblech. Der oxalsaurer Kalk verbrennt dabei zu einem Gemisch von Ätzkalk und kohlsaurem Kalk. Der Rückstand zeigt daher, mit einem Tröpfchen Wasser benetzt, stark alkalische Reaktion und löst sich in Salzsäure unter Aufbrausen. Die von den Flocken abfiltrierte Lösung kann enthalten: Phosphorsäure, Calcium, Magnesium.

c) Eine Probe derselben versetzt man mit Uranlösung. Gelblich-weißer Niederschlag von phosphorsaurem Uranyl beweist Phosphorsäure.

d) Die Hauptmenge versetzt man mit oxalsaurem Ammon: weißer Niederschlag beweist Calcium. Man erwärmt und filtriert vom Niederschlag ab, macht das Filtrat mit Ammoniak alkalisch: krystallinischer Niederschlag von Ammoniummagnesiumphosphat, phosphorsaurer Ammon-Magnesia, der oft erst nach längerer Zeit entsteht, beweist Magnesium.

e) Auf Ammoniak prüft man den reservierten Teil der ursprünglichen salzsauren Lösung durch Erhitzen mit Natriumcarbonatlösung.

V. Stoffwechseluntersuchungen von Organen.

A. Bestimmung des Glykogens in Organen nach Pflüger¹⁾.

Prinzip: Das Glykogen des betreffenden Organs wird durch Kochen des Organbreies mit Kalilauge aufgeschlossen, mit Alkohol gefällt, durch Kochen mit Salzsäure zu Traubenzucker gespalten und polarimetrisch bestimmt.

Erforderliche Reagenzien:

1. 60 % ige Kalilauge, aus Kaliumhydrat Merck Ia bereitet, deren Stärke mit Normalsalzsäure genau einzustellen ist.
2. 96 % iger Alkohol (Gew.-Proz.).
3. Eine frisch bereitete Mischung von 1 Vol. 15 % iger Kalilauge + 2 Vol. 96 % igem Alkohol.
4. Salzsäure, spec. Gew. 1.19.

Ausführung: 100 g Organbrei und 100 g heiße 60 % ige Kalilauge werden in ein 200-cm³-Kölbchen gebracht und gut durchgeschüttelt, um eine gleichmäßige Mischung zu erzielen. Das Kölbchen wird darauf in ein siedendes Wasserbad versenkt, und nach $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde nochmals durchgeschüttelt. Sobald die Flüssigkeit sich nicht mehr infolge der Erwärmung ausdehnt, wird das Fläschchen mit einem Gummistopfen verschlossen. Nachdem das Kölbchen 2 Stunden im siedenden Wasserbad verweilt hat, wird es nach dem Abkühlen in einen 400-cm³-Kolben entleert und mit siedend heißem Wasser nachgespült; nach dem Abkühlen mit Wasser bis zur Marke auffüllen und in ein Becherglas entleeren. Die Flüssigkeit enthält einen feinen Staub und Flöckchen.

Aus einer Bürette mißt man 100 cm³ der Flüssigkeit in ein Becherglas von 300 cm³, gibt 100 cm³ 96 % igen Alkohol dazu und mischt mit einem Glasstäbchen gut durch. Nach etwa $\frac{1}{4}$ Stunde hat sich der Glykogen Niederschlag abgesetzt, von dem durch ein quantitatives Filter von 15 cm Durchmesser abfiltriert wird, indem erst die klare überstehende Flüssigkeit und erst zum Schluß der Niederschlag selbst auf das Filter gebracht wird. Der Trichter wird mit einem Uhrglas bedeckt.

¹⁾ E. Pflüger, Das Glykogen. 2. Aufl. 1905.

Sobald die Flüssigkeit nahezu vollständig abgetropft ist, wäscht man das Glykogen mit der Kalilauge-Alkoholmischung 2mal nach, indem man sie aus dem Becherglas, in dem die Glykogenfällung vollzogen wurde, auf das Filter gibt. Dann wird mit 96%igem Alkohol nachgewaschen, wodurch das Glykogen zum Schrumpfen gebracht wird und Risse bekommt. Nunmehr wird das Glykogen in siedendem Wasser gelöst, das Filter mit dem unlöslichen Rückstand ausgekocht, das Kochwasser zu der Glykogenlösung filtriert und mit Salzsäure von spec. Gew. 1.19, die tropfenweise aus einer Bürette zugesetzt wird, gegen Lackmus neutralisiert. Scheidet sich hierbei viel Eiweiß aus, so muß nochmals filtriert und das Filter mit dem Rückstand wiederum ausgekocht werden. Die Flüssigkeit wird in einen 500- cm^3 -Kolben gebracht, weitere 25 cm^3 der Salzsäure hinzugegeben, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gut durchgeschüttelt.

Nun wird das Glykogen invertiert, indem der Kolben 3 Stunden ins siedende Wasserbad versenkt wird. Nach dem Erkalten wird filtriert und der gebildete Traubenzucker mittels Reduktion (s. I., A., 1., c) oder Polarisation bestimmt. Zur Ermittlung des Glykogenwertes multipliziert man den im 10- cm -Rohr erhaltenen Drehungswert mit 0.927.

B. Bestimmung des Gesamtacetons in Organen nach Messinger-Huppert, mit Enteiweißung nach Schenk.

Prinzip: s. I., B., b).

Erforderliche Reagenzien:

1. 2% ige Salzsäure.

2. 5% ige Quecksilberchloridlösung,

sowie die unter I., B., b) genannten Lösungen.

Ausführung: Mindestens 150 g Organbrei wird mit der gleichen Menge Wasser und je der doppelten Menge Salzsäure und Quecksilberchloridlösung versetzt und gut durchgerührt. Sobald sich der Eiweißniederschlag abgesetzt hat, kann man durch ein großes Faltenfilter filtrieren. Zur Bestimmung werden 500 cm^3 Filtrat benutzt und damit, wie unter I., B., b) angegeben, verfahren.

VI. Die Untersuchung des Grundumsatzes

nehmen wir mit der Apparatur von Krogh vor. Da diese nur den Sauerstoffverbrauch und nicht auch die Kohlensäureausscheidung zu bestimmen gestattet, hat der Bestimmung eine 2tägige Einstellung auf eine eiweiß- und fettarme, kohlenhydratreiche Kost voraufzugehen. Näheres über den Apparat und die Technik s. Krogh, Wiener klin. Wochenschr. 1922, Bd. 13, S. 291.

Zur Beurteilung, ob die erhaltenen Werte unternormal, normal oder erhöht sind, dient der Vergleich mit den nachfolgenden Harris-Benedictschen Tabellen für die normale Wärmeproduktion.

Tabellen zur Berechnung der normalen Wärmeproduktion nach Harris-Benedict.

(Carnegie, Int. Publ. 279. 253 ff., Washington 1919.)

Aus E. Grafe, Die pathologische Physiologie des Gesamtstoff- und Kraftwechsels
bei der Ernährung des Menschen. (Ergebn. d. Physiol. von L. Asher und K. Spiro,
1923, 21. Bd., 2. Abt.)

Erklärung:

Die Tabellen gelten für den Grundumsatz bei Erwachsenen im Alter von 21 bis 70 Jahren, mit Gewichten von 25 bis 124 *kg* und Körperlängen von 151 bis 200 *cm*.

Die Tabellen I und II geben die Daten für Männer, die Tabellen III und IV diejenigen für Frauen.

Bei bekanntem Geschlecht, Alter, Körpergewicht und -länge geschieht die Berechnung der durchschnittlichen normalen Calorienproduktion in der Weise, daß die dem Körpergewicht entsprechende Zahl (s. Tab. I für Männer, Tab. III für Frauen) jeweils addiert wird zu dem Faktor für Alter und Körperlänge (Tab. II für Männer, Tab. IV für Frauen).

Beispiel: 30 jähriger Mann, von 65 *kg* Gewicht, 1.70 *m* Körpergröße.

Gewicht: 65 *kg* = 960 Calorien (Tab. I)

Alter: 30 Jahre, Größe: 1.70 *m* = 648 Calorien (Tab. II)

Grundumsatz = 1608 Calorien.