

## **Mikromethoden zur Blutuntersuchung / von Ivar Bang.**

### **Contributors**

Bang, Ivar, 1869-1918.

### **Publication/Creation**

München : J. F. Bergmann, 1922.

### **Persistent URL**

<https://wellcomecollection.org/works/grapgsvt>

### **License and attribution**

Conditions of use: it is possible this item is protected by copyright and/or related rights. You are free to use this item in any way that is permitted by the copyright and related rights legislation that applies to your use. For other uses you need to obtain permission from the rights-holder(s).



Wellcome Collection  
183 Euston Road  
London NW1 2BE UK  
T +44 (0)20 7611 8722  
E [library@wellcomecollection.org](mailto:library@wellcomecollection.org)  
<https://wellcomecollection.org>

UNIVERSITY  
COLLEGE  
LONDON



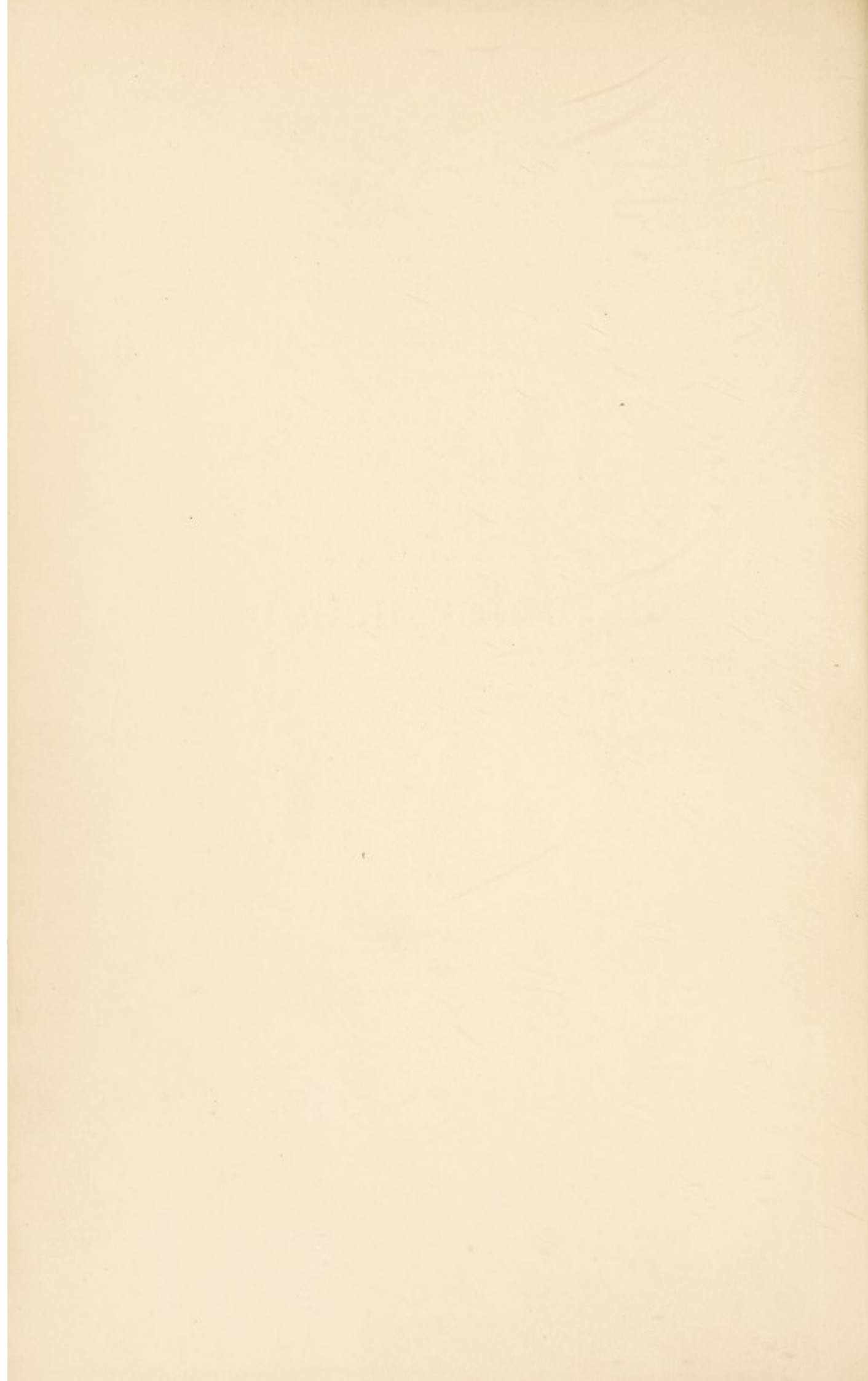
22500549010

ME.

20 BAN

Med  
K31494

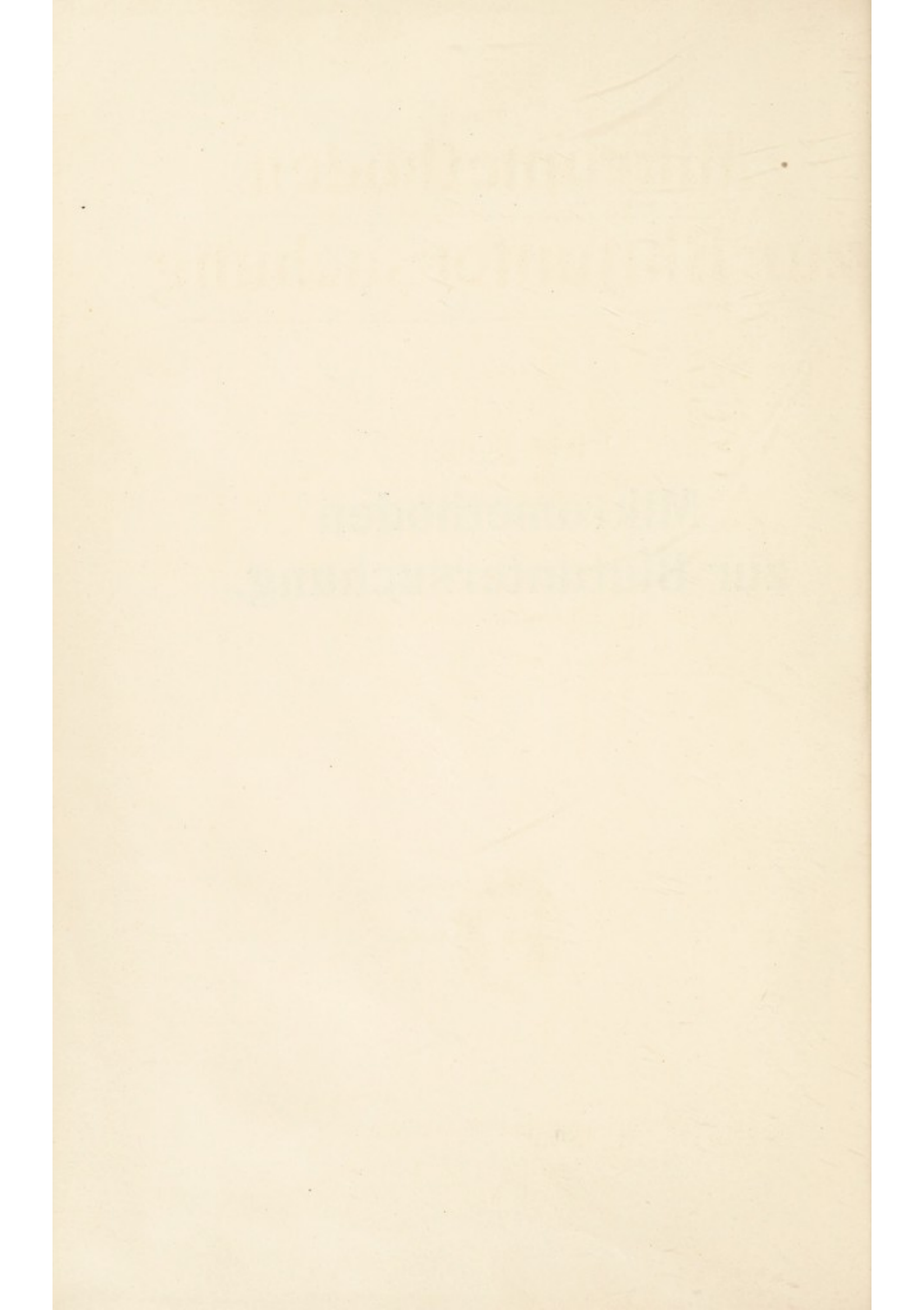




Cinvas  
130

hak  
10925

# Mikromethoden zur Blutuntersuchung.



# Mikromethoden zur Blutuntersuchung

Von

**Ivar Bang†**

weiland o. Professor der physiologischen und medizinischen Chemie  
an der Universität Lund

**Vierte und fünfte unveränderte Auflage**

Mit 7 Abbildungen im Text



UNIVERSITY  
COLLEGE  
LONDON

**München und Wiesbaden**

Verlag von J. F. Bergmann

1922.





Digitized by the Internet Archive  
in 2017 with funding from  
Wellcome Library

<https://archive.org/details/b29812616>

## Vorwort.

---

Die vorliegende Auflage unterscheidet sich von der früheren insofern, als in jener meine Originalmitteilungen über die meisten Methoden mit Belegen enthalten waren, während in dieser Ausgabe nur dasjenige besprochen wird, was für die praktische Ausübung zu wissen notwendig ist. Betreffs eingehenderer kritischer Untersuchungen muss ich daher auf die vorhergehende Auflage dieses Werkes, sowie auf meine Veröffentlichungen in der Biochemischen Zeitschrift hinweisen. Dafür enthält diese neue Ausgabe viele praktische Einzelheiten, Verbesserungen sowohl in bezug auf die Ausführung der Bestimmungen, als auch in bezug auf die anzuwendenden Apparate, welche in vieler Hinsicht einfacher, eleganter und leistungsfähiger geworden sind.

Abgesehen von den von mir und meinen Schülern ausgearbeiteten Methoden sind ausserdem drei von Prof. Bock und seinen Schülern Dr. Buchholtz, Dr. Jversen und Dr. Friderichsen angegebene Verfahren zur Bestimmung von Jodiden, Ammoniak und Salizylsäure im Blute aufgenommen, da sie auf demselben allgemeinen Prinzip beruhen.

Herrn Dr. Czapski in Wiesbaden, der die sprachliche Korrektur übernommen hat, spreche ich meinen verbindlichsten Dank aus.

Meinem Freunde, Prof. Bock in Copenhagen, bin ich für die mir erteilten Ratschläge zu grossem Dank verpflichtet und widme ihm in Erinnerung an unsere langjährige Freundschaft dieses Büchlein.

---

# 1000000

The first part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The second part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The third part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The fourth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The fifth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The sixth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The seventh part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The eighth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The ninth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind. The tenth part of the book is devoted to a description of the various forms of the human mind, and to a discussion of the various theories of the origin of the human mind.



## Ivar Bang.

Am 11. Dezember 1918 starb Ivar Bang in seinem Laboratorium; am Arbeitstisch beschäftigt, fiel er ohne vorhergehende Krankheit plötzlich nieder und war in einigen Minuten tot. Er hatte soeben mit einem Schüler wissenschaftliche Fragen, eifrig und interessiert wie je, diskutiert und Pläne für die Arbeiten der nächsten Tage besprochen. Es war eine Coronarsklerose, die sein Leben beendete.

Bang war in Gran, Norwegen, 1869 geboren und war also bei seinem Tode nur 49 Jahre alt. Sein Arztexamen absolvierte er 1895 in Christiania und wurde in demselben Jahre daselbst als Assistent des physiologischen Institutes angestellt. Während einiger Monate der Jahre 1896 und 1897 studierte er analytische Chemie bei Fresenius in Wiesbaden und 1897—1899 physiologische Chemie bei Hammarsten in Upsala. 1899 übersiedelte er nach Lund als Vorsteher des physiologisch-chemischen Instituts und wurde 1904 zum ordentlichen Professor der physiologischen Chemie ernannt.

Mit Bangs Hinscheiden hat die medizinische Wissenschaft einen schwer zu ersetzenden Verlust erlitten. Was er wissenschaftlich geleistet hat, lässt sich nicht in einigen Zeilen ausdrücken; vom Hauptsächlichsten geben jedoch Bangs drei bekannte Monographien: Die Lipoide, der Blutzucker und die Mikromethoden beredtes Zeugnis. Ganz besonders die letztgenannte Arbeit hat Bangs Namen berühmt gemacht. Diejenigen Untersuchungen, welche die Grundlage für diese Monographien bilden, haben ja neue, weite Aussichten für die Wissenschaft eröffnet und sich als ausserordentlich erfolgreich für die medizinische Klinik erwiesen.

Aber wir, die täglich mit Bang zusammen waren, hofften von ihm noch viel mehr und diese unsere Hoffnungen wurden durch seinen Tod grausam vereitelt.

Wir sahen, wie er während der letzten Jahre in vielleicht noch höherem Grade als früher von neuen Ideen für kommende Untersuchungen sozusagen überquoll und wie er von einer so intensiven Arbeitsfreude erfüllt war, wie man sie nur selten und bei ganz wenigen Leuten trifft. Nie scheute er sich vor noch so grosser Mühe, um seine wissenschaftlichen Ziele zu erreichen, nie konnte man ihm eine Untersuchung vorschlagen, deren Ausführung

ihm zu schwer erschien. Fielen die Resultate nach der Berechnung aus, so war er entzückt, taten sie es nicht, so freute es ihn bisweilen ebenso in der Hoffnung, eventuell noch bemerkenswerteren Entdeckungen auf die Spur zu kommen.

Diese Eigenschaften Bangs machten das Arbeiten mit ihm zu einem grossen Vergnügen, und zweifelsohne bewahren auch alle, welche als Mitarbeiter oder Schüler mit Bang gearbeitet haben, diese Arbeitszeit in schöner Erinnerung, gewürzt wie sie war durch angeregte Unterhaltungen über wissenschaftliche oder zur Abwechslung auch über allgemein interessante Fragen, bei welchen Bangs originelle Auffassung, seine dialektische Schlagfertigkeit, sowie seine Neigung zu Paradoxen alle Anwesenden belebten.

Der Umgang mit Bang war überhaupt immer sehr anregend. Er war eine vielseitig interessierte, fein gebildete, auch mit musikalischen Gaben ausgestattete Persönlichkeit. Stark in seinen Sympathien wie in seinen Antipathien und dazu ein Mann, der den Streit eher liebte als vermied, hatte er freilich nicht nur Freunde, diese aber standen ihm um so näher und vermissen durch sein Hinscheiden nicht nur den hervorragenden Gelehrten, sondern auch den lieben, treuen Freund mit dem reichen, warmen Gefühlsleben.

Lund, Oktober 1919.

**J. Forssman.**

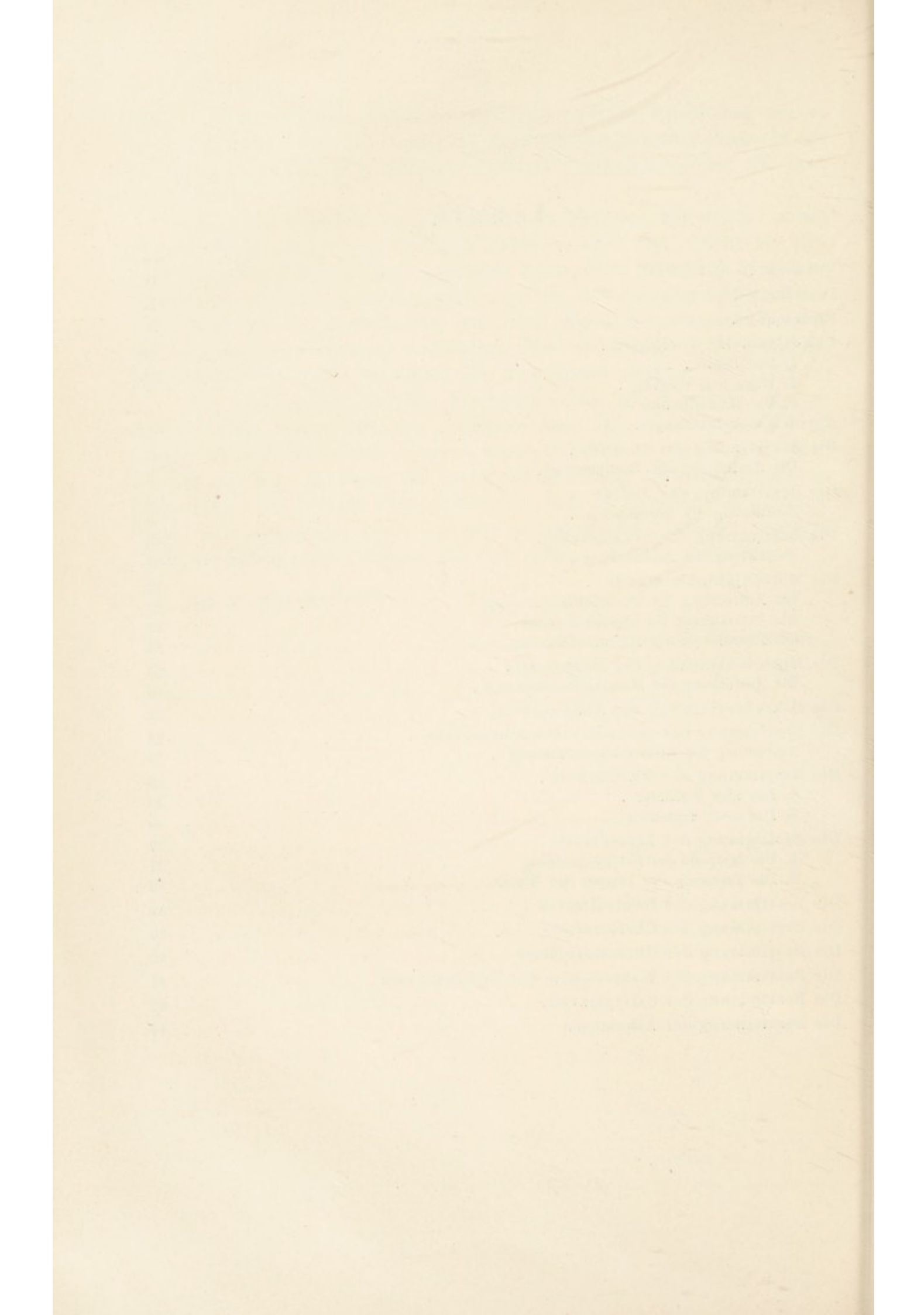


# Inhalt.

---

|                                                            | Seite |
|------------------------------------------------------------|-------|
| Vorwort . . . . .                                          | VII   |
| Ivar Bang . . . . .                                        | IX    |
| Einleitung . . . . .                                       | 1     |
| Das allgemeine Verfahren . . . . .                         | 2     |
| 1. Das Papier . . . . .                                    | 2     |
| 2. Wage und Wägung . . . . .                               | 3     |
| 3. Die Blutentnahme . . . . .                              | 5     |
| 4. Nachbehandlung . . . . .                                | 6     |
| Die Bestimmung der Chloride . . . . .                      | 7     |
| Die Ausführung der Bestimmung . . . . .                    | 8     |
| Die Bestimmung der Jodide . . . . .                        | 9     |
| Ausführung der Bestimmung . . . . .                        | 9     |
| Die Bestimmung der Alkaleszenz . . . . .                   | 10    |
| Ausführung der Bestimmung . . . . .                        | 12    |
| Die Mikrokjeldahlmethode . . . . .                         | 13    |
| Die Ausführung der Stickstoffbestimmung . . . . .          | 22    |
| Die Bestimmung des Reststickstoffes . . . . .              | 23    |
| Die Ausführung der Mikrobestimmung . . . . .               | 24    |
| Die Mikrobestimmung der Harnstoffe . . . . .               | 25    |
| Die Ausführung der Harnstoffbestimmung . . . . .           | 26    |
| Die Mikrobestimmung der Aminosäuren . . . . .              | 27    |
| Die Bestimmung des präformierten Ammoniaks . . . . .       | 28    |
| Ausführung der Ammoniakbestimmung . . . . .                | 29    |
| Die Bestimmung des Blutzuckers . . . . .                   | 30    |
| A. Das alte Verfahren . . . . .                            | 30    |
| B. Das neue Verfahren . . . . .                            | 35    |
| Die Bestimmung der Lipoidstoffe . . . . .                  | 37    |
| A. Die Methode der Fettbestimmung . . . . .                | 37    |
| B. Die Trennung der Lipoide des Blutes . . . . .           | 38    |
| Die Bestimmung des Neutralfettes . . . . .                 | 39    |
| Die Bestimmung des Cholesterins . . . . .                  | 40    |
| Die Bestimmung der Cholesterinester . . . . .              | 40    |
| Die Bestimmung des Wassers bzw. der Trockenmasse . . . . . | 41    |
| Die Bestimmung der Salizylsäure . . . . .                  | 42    |
| Die Bestimmung der Albumosen . . . . .                     | 44    |

---





## Einleitung.

Obwohl keineswegs sämtliche normal oder pathologisch vorkommenden Blutbestandteile nach den hier mitgeteilten Methoden bestimmt werden können — hauptsächlich deshalb, weil viele in zu geringer Menge im Blute auftreten — sind doch Verfahren für so viele — und zwar die wichtigsten — Komponenten des Blutes ausgearbeitet worden, dass man von einer allgemeinen Methode zur Untersuchung desselben sprechen kann. Im folgenden sollen nun Mikromethoden zur Bestimmung der Chloride, der Jodide, der Alkaleszenz, des Zuckers, des Gesamtstickstoffs, des Eiweissstickstoffs, des Albumosenstickstoffs, des Reststickstoffs, des Harnstoffs und der Aminosäuren, des Ammoniaks, des Neutralfettes, des Cholesterins, der Phosphatide und der Fettsäuren, der Cholesterinester, des Wassers und der Trockenmasse, sowie der Salizylsäure beschrieben werden. Wahrscheinlich lassen sich ausserdem noch zur Bestimmung anderer Bestandteile des Blutes, z. B. von Kalk und Brom, ähnliche Mikromethoden ausarbeiten. Das Verfahren, welches ursprünglich nur zur Bestimmung von Blutzucker angegeben wurde, hat sich also recht entwicklungsfähig erwiesen.

Wie bemerkt, sind sämtliche Methoden auf dasselbe allgemeine Prinzip gegründet worden. Dasselbe besteht darin, dass das Blut durch ein kleines Stückchen Löschpapier aufgesaugt wird. Dies Stückchen Papier dient als Filter und hält nach Zusatz eines Lösungsmittels alle in dem betreffenden Lösungsmittel unlöslichen Blutbestandteile zurück, die die weitere Bestimmung beeinträchtigen könnten. Man hat also hauptsächlich nur das geeignete Lösungsmittel für den zu bestimmenden Blutbestandteil sowie eine sichere Analysenmethode für denselben ausfindig zu machen. Die grundlegende Behandlung des Blutes bleibt infolgedessen in jedem Fall dieselbe.

Demgemäss soll zuerst das allgemeine Verfahren besprochen werden. Dann folgt die Beschreibung der Methoden zur Bestimmung der einzelnen Blutbestandteile.



## Das allgemeine Verfahren.

Dasselbe besteht darin, dass man ein paar Tropfen Blut durch ein kleines gewogenes Stückchen Löschpapier aufsaugen lässt. Darauf wird das Papier wieder gewogen und mit dem betreffenden Lösungsmittel behandelt. Hierbei kommen folgende Punkte in Betracht: 1. Das Papier. 2. Die Wage und die Wägung. 3. Das Aufsaugen des Blutes. 4. Die weitere Behandlung der Blutprobe. Es soll gleich hier bemerkt werden, dass alle, auch die kleinsten Einzelheiten für das Gelingen der Bestimmung von Wichtigkeit sind; wenn dieselben auch häufig überflüssig oder ohne Bedeutung zu sein scheinen, so sind sie nichtsdestoweniger beinahe immer von grosser Wichtigkeit, und ihre Nichtbeachtung kann viel Verdruss bereiten. Gerade diese Einzelheiten sind oft die Frucht langwieriger und schwieriger Untersuchungen, und es ist ihnen kaum anzusehen, dass ihre Ausarbeitung solch grosse Mühe verursacht hat. Beachtet man aber diese Vorschriften nicht, so wird man nachträglich ihre Bedeutung sicher erkennen. Auf der anderen Seite bilden diese Einzelheiten organische Bestandteile des gesamten Verfahrens und fügen sich so natürlich in das Ganze ein, dass man sie bald bei der Ausführung der Bestimmungen ganz automatisch beachtet. Aus diesem Grunde aber soll man sich bei der Einübung der Methode peinlich genau nach den Vorschriften richten.

### 1. Das Papier.

Von den üblichen Handelssorten Filtrierpapier ist kein einziges brauchbar, weil sie nicht die Fähigkeit haben, das Bluteiweiss quantitativ zurückzuhalten. Bei der Behandlung mit dem Lösungsmittel trennt sich etwas Eiweiss von dem Papier, so dass man genötigt ist, die Lösung zu filtrieren. Dagegen ist Löschpapier vorzüglich geeignet <sup>1)</sup>. Beim Ausprobieren der mir zugänglichen Sorten Löschpapier erwiesen sich die schwedischen und deutschen Fabrikate weniger geeignet als einige englische Fabrikate. Von ihnen bewährte sich am besten die Marke E. J. K., bezogen durch die Aktien-Gesellschaft Emil Jensen, Kopenhagen. Das einzelne Blatt dieses Papiers soll mindestens 50 g wiegen; solche von geringerem Gewicht sind nicht zu verwenden, da sie zu dünn sind. Jedes Löschpapier enthält Verunreinigungen, die bei den Mikromethoden zu Fehlern Veranlassung geben können und deshalb entfernt werden müssen. Die Reinigung des Papiers wird je nach seiner Verwendung auf verschiedene Weise ausgeführt.

Für die Zuckerbestimmung wird das Papier in Streifen von 26 mm Breite geschnitten und mehrmals erst mit Essigsäure enthaltendem, dann mit reinem destillierten Wasser von 50—60° ausgezogen, um Verunreinigungen zu entfernen, die sonst bei der Bestimmung Jod verbrauchen würden. In jeder der beiden Waschflüssigkeiten verbleibt das Papier mehrere Stunden,

<sup>1)</sup> Doch haftet defibriniertes und dekalziniertes Blut weniger fest an Löschpapier.



während welcher Zeit öfter umgerührt und dafür gesorgt wird, dass die Blätter nicht zusammenkleben; dann wird das Papier bei Zimmerwärme getrocknet, in Stücke von  $16 \times 26$  mm Grösse zerschnitten und in Schachteln oder in Gefässen mit Glasverschluss aufbewahrt.

Für Stickstoffbestimmungen wird das Papier zunächst in derselben Weise behandelt. Nachdem es aber zerschnitten ist, wird es mit Wasser noch so lange gewaschen, bis eine Probe mit etwa 10 ccm Wasser versetzt, mit Nessler's Reagens keine Reaktion mehr gibt. Nun giesst man das Wasser ab, trocknet das Papier an der Luft und bewahrt es, vor Luft geschützt, in Gefässen oder Schachteln auf. Für Ammoniakbestimmungen muss das Papier besonders sorgfältig gereinigt werden.

Für Fettbestimmungen darf nur entfettetes Papier verwendet werden. Die zerschnittenen Papierstückchen werden mit siedendem Alkohol mehrere Stunden ausgezogen, an der Luft getrocknet und wie oben aufbewahrt.

Für die Bestimmung des Chlors und der anderen Stoffe kann dasselbe Papier wie zur Zuckerbestimmung verwendet werden. Für die Alkaleszenzbestimmung jedoch wird das Papier mit Wasser allein, ohne Säurezusatz gewaschen<sup>1)</sup>.

## 2. Wage und Wägung.

Vor dem Gebrauch wird das Papierstückchen zunächst gewogen. Dazu kann man zwar eine gewöhnliche analytische Wage benutzen. Viel schneller und bequemer führt man aber die Wägung mittels der Torsionswage von Hartmann und Braun, Frankfurt a. M., aus. Nur für die Bestimmung des Wassers, bzw. der Trockensubstanz hat sich die analytische Wage besser bewährt (s. unten S. 42). Das Papierstückchen wird mittels einer kleinen Klammer aus Messing an dem Wagebalken aufgehängt. Eine solche Klammer liegt den Schachteln mit Papierstückchen bei und ist auch einzeln käuflich. Der Arretierhebel (f) wird auf „Frei“ und darauf mittels des Einstellhebels (d) der Zeiger (b) auf den Nullpunkt eingestellt. Der Skalenzeiger (c) gibt dann das Gewicht des Papierstückchens in Milligrammen und Zehntelmilligrammen an. Die ganze Wägung lässt sich in etwa 2—3 Sekunden ausführen. Von der Torsionswage gibt es mehrere Ausführungsformen. Die jetzt meist verwendete ist folgende (siehe Fig. 1, S. 4). Es ist dies eine Wage mit einem Messbereich bis 500 mg mit Messerzeiger und Spiegelskala, die mit dem Zubehör, 3 Stahldrahtklammern<sup>2)</sup> zum Anhängen der Papierstückchen und einer Pinzette zum Preise von Mk. 120,— zuzüglich Teuerungszuschlag (zur Zeit 150%) geliefert wird. Wagen mit zwei Messbereichen von 250 und

<sup>1)</sup> Fertig ausgewaschene Löschpapierstreifen von vorgeschriebener Grösse für alle Arten von Bestimmungen können von Warmbrunn, Quilitz & Co., Berlin oder von Grave, Stockholm bezogen werden.

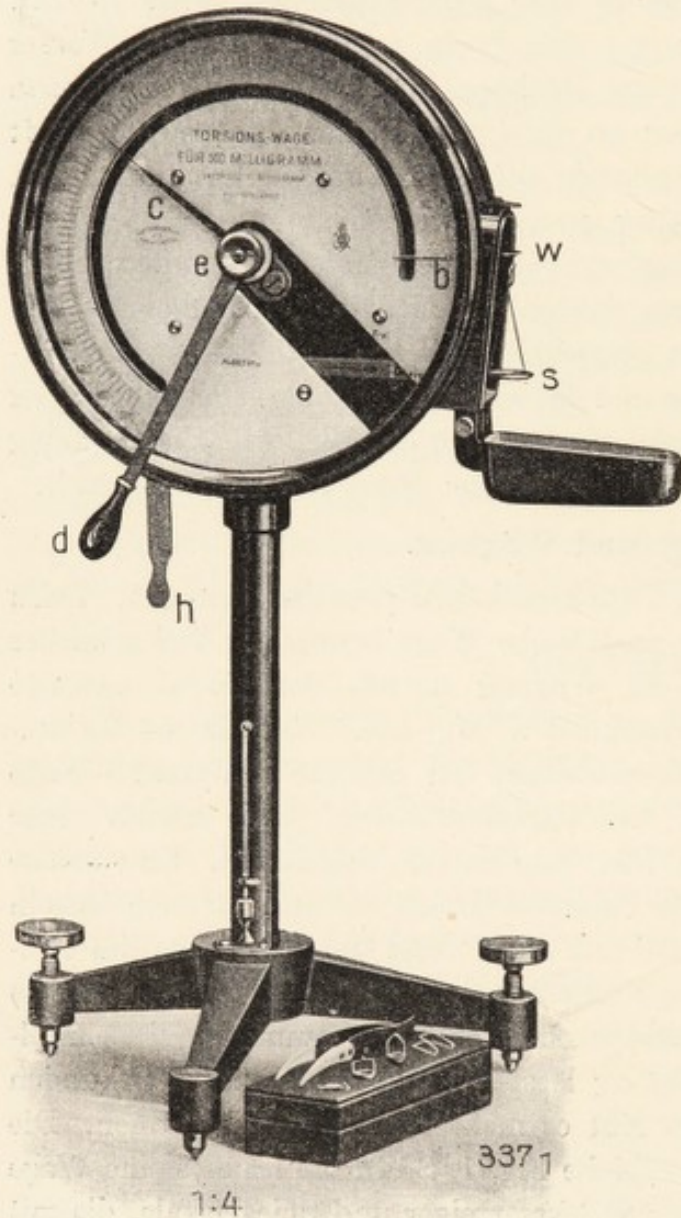
<sup>2)</sup> An Stelle der Stahldrahtklammern haben Hartmann & Braun neuerdings ein Drahtgestell (siehe Fig. 2, S. 4) ausgebildet, das sich gut bewährt hat und von der genannten Firma bezogen werden kann.



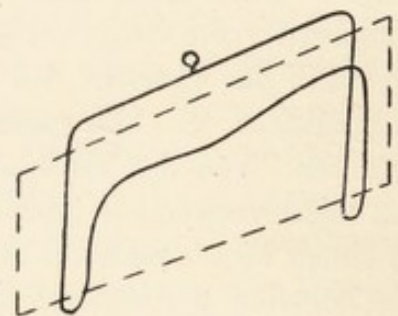
500 mg haben den Vorzug doppelter Empfindlichkeit, werden aber wegen der Möglichkeit, versehentlich Ablesungen auf der falschen Skala zu machen, weniger verwendet. Der Mehrpreis dafür beträgt Mk. 15,— zuzüglich Teuerungszuschlag.

Zweckmässiger und fast ebenso empfindlich wie eine Wage mit zwei

Messbereichen ist eine Wage mit unterdrückten Anfangswertender Skala, bei welcher der Messbereich nur von 200—500 mg reicht, auf der also Objekte von weniger als 200 mg nicht gewogen werden können. Dies wird dadurch erreicht, dass der Feder eine solche Vorspannung erteilt wird, dass der Wagebalken erst bei einer Belastung von 200 mg auf Null einspielt. Zur Prüfung der Nullstellung ist daher ein Normalgewicht von 200 mg erforderlich, das der Wage beigegeben wird. Der Mehrpreis dieser Ausführung beträgt gegenüber dem Grundpreis Mk. 5,— zuzüglich Teuerungszuschlag. Die grössere Empfindlichkeit dieser Wagen kommt dadurch zustande, dass



Figur 1.



Figur 2.

der volle Skalenbogen von etwa  $200^\circ$  für einen Bereich von  $500 - 200 = 300$  mg ausgenutzt wird, so dass sich für 1 mg ein Ausschlag von etwa  $\frac{200}{500} = \frac{2}{3}$  Bogengrad ergibt, während bei der normalen Wage der gleiche Skalenbogen für einen Bereich von 500 mg ausreichen muss, was für 1 mg einen Ausschlag von



$\frac{200}{500} = \frac{2}{5}$  Bogengrad, d. h. nur 60% der obigen Empfindlichkeit ergibt. Die

Wage mit zwei Messbereichen ist im übrigen nichts anderes als die mit unterdrückten Anfangswerten, nur mit dem Unterschied, dass die ganze untere Hälfte der Skala unterdrückt ist, und der eigentliche Messbereich nur mehr von 200—500 mg reicht. Um nun auch unterhalb 200 mg wiegen zu können, ist das oben erwähnte Normalgewicht zur Kontrolle des Nullpunktes so ausgebildet, dass es seinerseits wieder als Haken zum Anhängen einer Last benutzt werden kann. Man wägt also kleinere Lasten als 200 mg stets gemeinsam mit dem Normalgewicht und müsste den Betrag des letzteren von dem abgelesenen Gewicht abziehen, wenn nicht die Wage gleich mit einer zweiten Teilung versehen wäre, in der diese Rechnung bereits ausgeführt ist.

Will man eine Universalwage haben, die für alle Bestimmungen brauchbar ist, so soll man eine solche mit dem Messbereich von 0—1000 mg nehmen. Sonst ist für die Bestimmung von Zucker, Chlor und Reststickstoff die Wage mit dem Messbereich von 0—500 oder besser von 200—500 mg vorzuziehen. Dabei muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass ein Wägefehler von 0,5 mg keine Rolle spielt, da man doch meistens auf ganze Milligramme abrundet.

Schliesslich muss man noch darauf achten, dass die Wage immer auf demselben Platz stehen bleibt. Hat man sie auf einen anderen Platz gestellt, so muss man vor ihrer Benutzung prüfen, ob sich der Nullpunkt nicht verändert hat, und muss gegebenenfalls die Wage neu einstellen.

### 3. Die Blutentnahme.

Nach der Wägung des Papiers wird dasselbe mit Blut getränkt und dann sofort wieder gewogen. Hierbei macht sich der Vorteil der Torsionswage, die ausserordentlich rasche Ausführbarkeit der Wägung geltend, da infolge derselben ein in Betracht kommender Gewichtsverlust durch Wasserverdünnung nicht eintreten kann. Man entnimmt das Blut bei Kaninchen, Hunden, Katzen und Meerschweinchen aus einer Ohrvene, beim Menschen aus der Fingerbeere oder dem Ohr. Durch leises Streichen wird das Blut herausgedrückt und gleich in das Papier eingesaugt. Starker Druck ist unbedingt zu vermeiden, weil dabei auch Gewebeflüssigkeit austreten würde; bei zu heftigem Drücken erhält man bei Kaninchen schliesslich reine Lymphe. Kaninchen mit dünnen Ohren bluten immer schlecht. Solche Tiere sollte man am besten ausschalten. Kaninchen mit grossen Ohren — Rassekaninchen — bluten immer gut, besonders wenn man die Ohren, bevor die Vene geöffnet wird, etwas frottiert. Bluten Kaninchen schlecht, so kann man auch durch Bepinseln der Ohren mit Xylol eine starke Hyperämie erzeugen. Allerdings werden die Ohren später anämisch und bluten dann noch schlechter. Eine zweite Xylolbehandlung hilft in den



meisten Fällen nichts. Hunde bluten meistens gut. Ebenso auch Katzen und Meerschweinchen, letztere trotz der kleinen Ohren.

Es ist wichtig, das Aufsaugen und die nachfolgende Wägung des Blutes so schnell wie möglich vorzunehmen, weil das aufgesaugte Blut durch Verdunstung fortwährend Wasser verliert. Bei Zimmerwärme beträgt der Verlust ca. 0,5 mg in 1 Minute, im Sonnenlicht ist er doppelt so gross. Direktes Sonnenlicht bewirkt noch grössere Verluste und ist deshalb unbedingt zu vermeiden. Ein beträchtlicher Wasserverlust entsteht auch, wenn das mit Blut getränkte Papier bis zur Wage eine Strecke getragen wird. Am besten wird die Blutentnahme ganz in der Nähe derselben ausgeführt.

Beim Arbeiten in der Klinik kann man das Papierstückchen nach Aufsaugen des Blutes in ein Proberöhrchen überführen, das, um Wasserverluste zu vermeiden, auf dem Boden einen feuchten Wattebausch und darüber ein Stückchen Drahtnetz enthält; dann verschliesst man es mit einem Korkstopfen und bringt es so an die Wage.

Ein sehr häufig gemachter Versuchsfehler ist der, dass das Papier ganz mit Blut durchtränkt wird, weil man durch Verwendung der grösstmöglichen Blutmenge den Multiplikationsfehler zu verringern sucht. Man begeht aber hierdurch einen anderen um so grösseren Fehler. Denn erstens haftet das Eiweiss schlechter an dem Papier. Zweitens — und dies ist noch viel wichtiger — erfolgt die Diffusion der Extraktivstoffe bedeutend langsamer, wenn das Papier von einer mehr oder weniger dicken Kruste von Eiweiss umgeben ist. Selbst 24 Stunden genügen dann nicht für eine Extraktion, die sonst im Verlaufe von 10—30 Minuten beendet wäre. Ja, die Erfahrung hat gelehrt, dass man unter Umständen überhaupt keine quantitative Extraktion erzielen kann. Mehr als 120 mg oder höchstens 130 mg Blut dürfen nicht eingesaugt werden. Wünscht man mehr Blut für die Analyse anzuwenden, so muss man ein entsprechend grösseres Papierstückchen nehmen. Man lässt also nur so viel Blut durch das Papier aufsaugen, dass etwa  $\frac{8}{10}$  bis höchstens  $\frac{9}{10}$  des letzteren damit getränkt sind.

Andererseits darf man auch nicht zu wenig Blut nehmen. Weniger als 80 mg Blut darf man in der Regel nicht verwenden. Nur wenn der zu bestimmende Bestandteil in grosser Menge vorhanden ist, wird es sich empfehlen, bis auf 50 mg Blut herabzugehen (bei Koma, Urämie und Ikterus für Zucker, Reststickstoff- und Cholesterinbestimmungen).

#### 4. Nachbehandlung.

Nach der Wägung wird das bluthaltige Papier in ein Proberöhrchen übergeführt und mit der Lösung eines entsprechenden, je nach den verschie-



denen Bestimmungen wechselnden Reagenses versetzt. Nur bei der Bestimmung der Lipide (sowie des Wassers) wird das Papier zuerst getrocknet. Sonst empfiehlt es sich, in allen Fällen nicht so lange zu warten, bis das Papier völlig trocken wird. Die Erfahrung hat nämlich gelehrt, dass dann die Diffusion wesentlich langsamer erfolgt, auch haftet das Eiweiss schlechter an dem Papier. Man wartet am besten nur etwa 5 Minuten, bis das Papier nicht mehr feucht aussieht, und führt es dann erst in das Proberöhrchen über. Von der Lösung setzt man immer so viel hinzu, dass das Papier vollständig in der Lösung untertaucht und letztere einige Millimeter darüber steht. Je mehr die Lösung das Papier überragt, um so sicherer ist man, dass sich keine Eiweiss Spuren loslösen. Da man gewöhnlich nur 7—10 cm Lösung verwenden soll, empfiehlt es sich also, recht enge Proberöhrchen zu verwenden. Nur muss das Papier bis zum Boden hinuntergleiten. Wenn das Papier die obere Flüssigkeitsschicht berührt, erhält man immer unrichtige Werte.

Nach der Extraktion, die für die verschiedenen Blutbestandteile eine verschieden lange Zeit in Anspruch nimmt, wird die Flüssigkeit abgegossen und, falls sie nicht vollständig klar ist, filtriert. Das Papier wird dann einmal mit dem Extraktionsmittel ausgewaschen und die Auswaschflüssigkeit mit dem ersten Abguss vereinigt.

Schliesslich sei bemerkt, dass die Extraktion nicht länger andauern darf, als es der Vorschrift entspricht.

### Die Bestimmung der Chloride.

Die Methode beruht auf der Tatsache, dass man eine alkoholische Chloridlösung durch Titration mit  $n/100$ -Silberlösung und Kaliumchromat als Indikator ebenso genau bestimmen kann, wie eine wässrige Lösung durch Titration mit  $n/10$ -Silberlösung. Die Ursache hierfür liegt darin, dass das rotbraun gefärbte Silberchromat in Alkohollösung nicht dissoziiert ist, während es in wässriger Lösung, wenn auch nur zum kleinen Teil, gelb gefärbte Chromsäureionen bildet. Folglich genügt beim Titrieren in alkoholischer Lösung viel weniger Silberchromat, um den Farbumschlag erkennen zu lassen. Auch ist weniger Kaliumchromat als Indikator erforderlich.

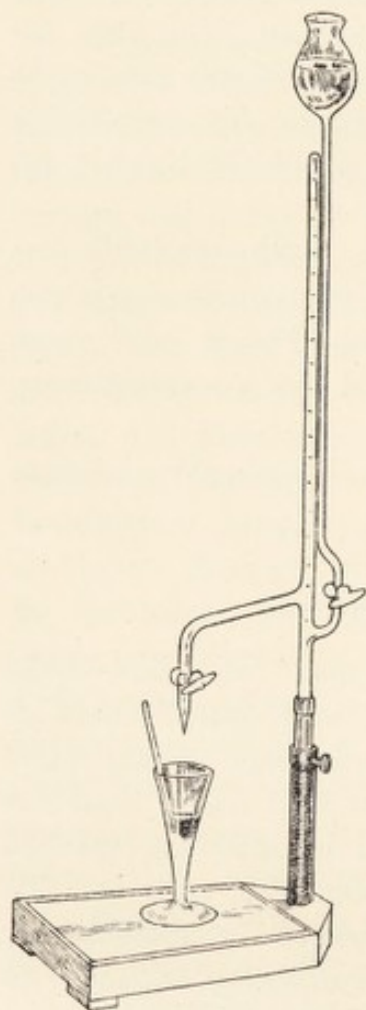
Alkohol ist weiter für den Gebrauch bei der Mikromethode ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für die Chloride des Blutes aus dem Grunde, weil durch denselben sonst keine die Reaktion störenden Verbindungen, unter denen namentlich die Eiweisskörper in Betracht kämen, gelöst werden. Allerdings ist das Lösungsvermögen des Alkohols für Kochsalz nicht gross, aber reichlich genügend für die bei der Mikrobestimmung in Frage kommenden Mengen. Ein 92<sup>0</sup>/<sub>100</sub>-iger Alkohol hat sich erfahrungsgemäss als der geeignetste erwiesen. Eine Extraktionszeit von 5 Stunden genügt, wenn das Blut noch



feucht mit Alkohol versetzt wird. An der Luft getrocknetes Blut erfordert jedoch 24 Stunden für die Extraktion. Man lässt das Blut am besten nicht trocken werden. In diesem Falle kann man das bluthaltige Papier ohne Schaden viel länger im Alkohol verweilen lassen.

### Die Ausführung der Bestimmung.

Nach Wägung des mit Blut getränkten Papiers wird dasselbe, nachdem das Blut vollständig angesaugt worden ist, d. h. nach etwa 5 Minuten, in ein



Figur 3.

Proberöhrchen übergeführt und mit so viel 92%-igem Alkohol versetzt, dass die Flüssigkeit etwa 4—5 mm über dem Papier steht. Nach wenigstens 5 Stunden wird der Alkohol in ein kleines Spitzglas, welches sich besser eignet als ein Becherglas, übergeführt und das Papier mit etwa 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Die Waschflüssigkeit wird mit dem ersten Abguss vereinigt. Inzwischen hat man n/100-Silberlösung in eine Mikrobürette nach Bang, Fig. 3 (eine in  $\frac{1}{20}$  ccm eingeteilte 10 ccm-Bürette mit Glashahn genügt auch) gebracht <sup>1)</sup>. Die Hähne der Bürette dürfen nicht eingefettet werden; die Büretten sind häufig mit Chromsäure-Schwefelsäure-Mischung zu reinigen. Mit einem Glasstabe fügt man nun zu der alkoholischen Lösung einen Tropfen gesättigter oder 7%-iger Kaliumchromatlösung als Indikator hinzu und titriert, indem man vorsichtig die ganze Zeit mit einem dünnen, etwa 2 mm starken Glasstabe die Flüssigkeit umrührt, bis ein Umschlag in lichtbraun eintritt, welcher nach Zusatz von einem Tropfen der Titerflüssigkeit im Überschuss scharf zu erkennen ist. Nur eines darf hierbei nicht befremden. Beim Zusatz des Chromates zum Alkohol fällt es als gelber Niederschlag aus und der Alkohol selbst bleibt farblos. Nach und nach aber wird infolge des Zusatzes der Massflüssigkeit der Alkohol so wasserhaltig, dass

etwas Chromat in Lösung geht und die Flüssigkeit demzufolge gelb gefärbt wird, und zwar um so stärker, je mehr Lösung zugesetzt wird. Diese reine kanariengelbe Farbe, die wegen des gebildeten kolloidalen Silberchlorids opalisiert,

<sup>1)</sup> Die Mikrobürette ist, wie Fig. 3 zeigt, in zweierlei Weise verbessert worden. Einerseits ist der Ausflusshahn horizontal gestellt und damit leichter zu handhaben, andererseits ist die Bürette an einem verstellbaren Stativ angebracht und kann also eine allgemeine Verwendung finden.



kann aber niemals mit der lichtbraunen Färbung des Umschlagspunktes verwechselt werden, wenn die Beleuchtung gut ist. Die Titration erfordert nämlich unbedingt ein gutes Licht, am besten ist Tageslicht.

Von den verbrauchten Kubikzentimetern zieht man so viel ab, als von der Massflüssigkeit für den blinden Versuch, welcher immer angestellt werden muss, verbraucht wurde. Diese Menge beträgt gewöhnlich 0,05 ccm, kann aber auch geringer sein. Die Differenz, mit 0,585 multipliziert, entspricht der Menge des in der angewandten Substanz vorhandenen Kochsalzes in Milligrammen. Will man die Rechnung vereinfachen, so kann man 11,70 ccm  $n/10$ -Silbernitratlösung auf 100 ccm verdünnen und braucht dann nur mit 0,5 zu multiplizieren.

Es empfiehlt sich, die Methode zuerst unter Verwendung einer  $n/100$ -Kochsalzlösung einzuüben, ehe man zu den Versuchen mit Blut übergeht.

## Die Bestimmung der Jodide

(nach Dr. J. Buchholtz).

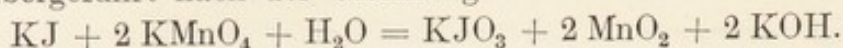
Für diese Bestimmung wird etwas mehr Blut in Arbeit genommen. Es werden dementsprechend etwas grössere Stücke Löschpapier von rechteckiger Form ( $3 \times 4$  cm) verwandt. Ihr Gewicht beträgt etwa 250 mg. Sie werden der Länge nach zusammengefaltet und die Stelle der Faltung durch einen einzelnen Stich mit einem dünnen Seidenfaden an beiden Enden fixiert, worauf man die beiden zusammengelegten Seiten wieder voneinander entfernt, so dass das ganze Stück die Gestalt eines Bootes erhält; es darf nur so gross sein, dass es leicht in ein Reagenzglas von gewöhnlicher Form hinabgelassen werden kann, kann aber trotzdem 600—700 mg Blut aufsaugen. Die Wägung des Papiers vor und nach dem Aufsaugen des Blutes geschieht auf einer Torsionswaage mit einem Messbereich bis 1000 mg. Nach Zusatz einer Salzlösung diffundieren die Jodide aus. Sie werden durch Permanganat in Jodsäure übergeführt, welche mit Jodkalium die 6-fache Jodmenge in Freiheit setzt.

### Ausführung der Bestimmung.

Nach der Wägung wird das bluthaltige Papier in ein reines, trockenes Proberöhrchen übergeführt und mit etwa 15 ccm kochender, 20%-iger Kaliumchloridlösung, die durch Zusatz von 15 ccm 25%-iger Salzsäure pro Liter angesäuert worden ist, übergossen. Dadurch koaguliert das Blut auf dem Papier, während die Flüssigkeit klar bleibt; einzelne losgerissene Flocken von koaguliertem Eiweiss stören die weitere Analyse nicht. Nach einigen Stunden sind die im Blut vorhandenen Jodide in die Lösung diffundiert. Die Lösung bringt man darauf in einen 100 ccm-Erlenmeyerkolben, spült das Proberöhrchen einmal mit kochendem Wasser nach und versetzt mit 2 ccm 2  $n$ -Kali-



lauge, einigen Kristallen Permanganat und ein wenig Wasser. Nachdem man nun erhitzt und 1 Minute im Sieden erhalten hat, sind die Jodide quantitativ in Jodat übergeführt nach der Gleichung:



Dann wird tropfenweise Alkohol zugesetzt, wodurch das überschüssige Permanganat zu unlöslichem Braunstein ( $MnO_2$ ) reduziert wird, worauf der Rest des Alkohols durch Kochen entfernt wird. Das Jodat wird dadurch nicht beeinflusst.

Man filtriert nun den Braunstein ab und wäscht zweimal mit heissem Wasser nach. Um ein vollständig klares Filtrat zu erhalten, ist es notwendig, ein dichtes Filter zu benutzen. Ausser den Jodiden enthält das Filtrat u. a. Nitrite, die durch Oxydation stickstoffhaltiger Bestandteile des Blutes gebildet sind. Sie müssen unbedingt entfernt werden, da sie die folgende Titration beeinflussen. Dies erzielt man durch Zusatz von 10 ccm Essigsäure und etwa 1 g Chlorammonium. Durch 5 Minuten langes Kochen werden die Nitrite in Wasser und Stickstoff zerlegt.

Nach dem Kaltwerden der Flüssigkeit werden einige Tropfen 5%-iger Kaliumjodidlösung zugesetzt und mit Salzsäure angesäuert. Es wird dann eine der Jodatmenge entsprechende Jodmenge frei gemacht, die also 6 mal so gross ist als der ursprüngliche Jodgehalt der Blutprobe und die nach Zusatz von ein paar Tropfen Stärkelösung durch Titration mit n/250-Thiosulfatlösung<sup>1)</sup> ermittelt wird.

Bei besonders geringem Jodgehalt kann man zwei oder mehrere Blutproben zusammen oxydieren.

### Die Bestimmung der Alkaleszenz.

Nur die durch Titration bestimmbare Alkaleszenz kommt hier in Frage. Man hat dabei entweder das Säurebindungsvermögen des Blutes oder das sogenannte diffusible Alkali zu ermitteln. Im ersteren Falle brauchen die Eiweisskörper vorher nicht abgeschieden zu werden, im letzteren Falle ist dies jedoch erforderlich. Zu diesem Zweck muss das Bluteiweiss auf dem Papier koaguliert werden, während das Alkali herausdiffundiert und in dem Extrakte bestimmt werden kann. Je nachdem die Koagulation bei Gegenwart oder bei Abwesenheit einer bestimmten Menge Säure ausgeführt wird, bestimmt man entweder das Säurebindungsvermögen oder das diffusible Alkali. Es hat sich gezeigt, dass man nur durch Verwendung von Alkohol hierbei zum Ziele kommt. Am besten bedient man sich frisch destillierten Alkohols von 80%, da das Eiweiss durch Einwirkung desselben quantitativ koaguliert. Durch eine weitere Extraktion mit Wasser geht kein Eiweiss mehr in Lösung.

<sup>1)</sup> Oder auch n/100—n/200 Thiosulfatlösung.



Daraus, dass 10 ccm 80%-igen Alkohols 2,2 mg Soda zu lösen vermögen, dürfte man schliessen, dass alles diffusible Alkali schon in den Alkohol überginge. Dies ist aber bei weitem nicht der Fall. Nur etwa ein Drittel desselben findet sich in der alkoholischen Lösung, während etwa zwei Drittel später durch Wasser extrahiert werden können. Diese Ergebnisse stimmen also mit den Angaben Hamburgers, welcher alles diffusible Alkali schon durch Alkohol extrahiert haben will, durchaus nicht überein. Indessen fällt Hamburger<sup>1)</sup> die in dem Blut enthaltenen Eiweisskörper mit nur zwei Volumen Alkohol, während hier etwa 10 ccm Alkohol für zirka 0,1 g Blut angewandt werden. (Ausserdem wird der Alkohol bis zum Kochen erhitzt.) Wahrscheinlich geht nach Hamburgers Verfahren mehr Alkali in den Alkohol über. Andererseits hat Hamburger das Eiweiss nach der Behandlung mit Alkohol nicht auf diffusible Alkali untersucht. Ferner hat sein Verfahren den Fehler, dass die Eiweisskörper durch Mischung des Blutes mit zwei Volumen Alkohol und sofortige Filtration bei weitem nicht vollständig abgeschieden werden. Das in Lösung gebliebene Eiweiss muss aber — wie bei der Bestimmung nach Loewy ohne Entfernung des Eiweisses — Säure binden. Andererseits ist es nicht abgemacht, dass alles diffusible Alkali in den Alkohol übergeht. Folglich kann man beim Arbeiten nach Hamburgers Verfahren nicht genau wissen, was man bestimmt.

Da nach unserem Verfahren nur ein Teil des Alkalis in den Alkohol übergeht, während letzterer tatsächlich viel mehr Alkali — in Form von Soda — aufzulösen vermag, kann man mit Wahrscheinlichkeit folgern, dass nur das freie Alkali in Lösung gegangen ist, während das gebundene Alkali zurückbleibt. Beim Zusatz von Wasser wird das gebundene, aber diffusible Alkali frei gemacht und geht in die wässrige Lösung über. Für die Richtigkeit dieser Vorstellung spricht noch die Tatsache, dass viel mehr Säure beim Titrieren des Alkohols in Gegenwart des bluthaltigen Papiers verbraucht wird, als nach vorheriger Entfernung desselben. Die Säure wird demgemäss von den Blutbestandteilen (zum Teil aber auch von dem Papier selbst) gebunden und diese Verbindung dann von dem Alkohol nicht abgespalten. Infolgedessen ist es daher angebracht, sowohl das freie Alkali, als auch das gebundene, aber diffusible getrennt für sich zu bestimmen, was auch sehr einfach ist. Die alkoholische Lösung wird auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft, der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen. Titriersäure hinzugefügt und der Überschuss der letzteren bestimmt. In ganz derselben Weise verfährt man mit dem wässrigen Extrakt. Wegen der hier in Frage kommenden, äusserst geringen Säuremengen kann man den Säureüberschuss nicht azidimetrisch durch Titration mit Lauge, mit gutem Erfolge aber jodometrisch ermitteln, da die Säure nach Zusatz von Jodkalium und Kalium-

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Phys. Phys. Abt. 1898.



jodat eine äquivalente Menge Jod frei macht, die durch Titration mittels einer  $n/100$ — $n/200$ -Thiosulfatlösung bestimmt werden kann (siehe näheres Seite 18). Hierbei könnte aber die Möglichkeit eintreten, dass etwas Jod von den Blutlipoiden, welche in die alkoholische Lösung übergegangen sind, verbraucht wird. Besonders angestellte Versuche haben jedoch gezeigt, dass dies bei der gegebenen Versuchsanordnung nicht der Fall ist. Schliesslich sei bemerkt, dass eventuell noch vorhandene Spuren Alkohol ebenfalls kein Jod verbrauchen.

### Ausführung der Bestimmung.

Die bluthaltigen Papierstückchen werden, nachdem sie einige Minuten an der Luft eingetrocknet sind, in Proberöhrchen übergeführt, mit etwa 10 ccm 80%-igen Alkohol versetzt, 15 Minuten sich selbst überlassen, dann bis zum Sieden erhitzt und erkalten gelassen. Alles extrahierbare Alkali ist jetzt in den Alkohol übergegangen. Die Papierstückchen werden nun mit einem Glasstabe, an welchem ein hakenförmig umgebogenes Platindrähtchen befestigt ist, herausgenommen und in andere Proberöhrchen übergeführt. Der Alkohol wird im Wasserbade verjagt, zu dem Rückstand 1 ccm  $n/200$ -Schwefelsäure und 8—10 ccm Wasser getan und gekocht. Schliesslich fügt man nach dem Erkalten 0,5 ccm 5%-ige Jodkaliumlösung und einen Tropfen 2%-iger Kaliumjodatlösung hinzu und titriert nach 5 Minuten mit  $n/200$ -Thiosulfatlösung bis zur Entfärbung. Die Papierstückchen werden darauf mindestens eine Stunde lang mit Wasser extrahiert, dann herausgenommen und die wässrige Lösung ganz in derselben Weise mit  $n/200$ -Schwefelsäure, Kaliumjodid- und -jodatlösung versetzt und mit  $n/200$ -Thiosulfatlösung titriert, wie es bei der alkoholischen Lösung geschehen ist <sup>1)</sup>.

Zur Bestimmung des Säurebindungsvermögens setzt man am besten zu der durch die zweite Extraktion erhaltenen Lösung 0,3—0,5 ccm  $n/10$ -Schwefelsäure oder mehr hinzu und entfernt die Papierstücke nach einer Stunde. Man muss so viel Säure zusetzen, als überhaupt gebunden werden kann. Auch muss man Parallelversuche mit Papier allein anstellen, da dasselbe ebenfalls etwas Säure bindet. Das Säurebindungsvermögen ist zum Teil von der vorhandenen Säuremenge abhängig. Aus diesem Grunde muss man einen bedeutenden Überschuss an Säure verwenden, so viel nämlich, dass eine zweite Probe mit höherem Säurezusatz nicht mehr zu binden vermag. (Aus diesem Grunde macht es den Eindruck, als ob diese letzte Bestimmung viel weniger Bedeutung als die übrigen Alkaleszenzbestimmungen besitzt.)

<sup>1)</sup> Das Papier selbst bindet nur sehr wenig Alkali. Will man diesen Umstand bei genauem Arbeiten berücksichtigen, so kann man das Bindungsvermögen durch einen blinden Versuch mit demselben Papier unter Zusatz von 100 mg 0,5%-iger Sodalösung bestimmen.



## Die Mikrokjeldahlmethode.

Die Bestimmung sämtlicher stickstoffhaltiger Bestandteile des Blutes geschieht durch Verwendung einer Mikrokjeldahlmethode, welche Resultate mit einer Genauigkeit von etwa 0,002—0,003 mg liefert.

Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, dass das nach der Behandlung des Blutes mit Schwefelsäure und einem Katalysator gebildete Ammoniak durch heissen Wasserdampf in die Vorlage übergeführt und dann jodometrisch bestimmt wird. Die Vorteile dieser Methode sind: 1. Die Destillation geht sehr rasch vor sich und ist bei den meisten Bestimmungen nach 2 Minuten beendet. 2. Die Fehlerquellen sind teils gänzlich entfernt, teils auf ein so geringes Mass reduziert, dass sie keine praktische Bedeutung besitzen. 3. Die Korrekturen für den Ammoniakgehalt der Lösungen sind äusserst klein, was von Wichtigkeit ist, wenn es sich um die Bestimmung geringer Spuren Stickstoff handelt. 4. Nach dem jodometrischen Verfahren können äusserst geringe Mengen Stickstoff mit grosser Genauigkeit bestimmt werden, was auf azidimetrischem Wege nicht in demselben Masse möglich ist.

Für die Mikrokjeldahlmethode kommen folgende Gesichtspunkte in Betracht:

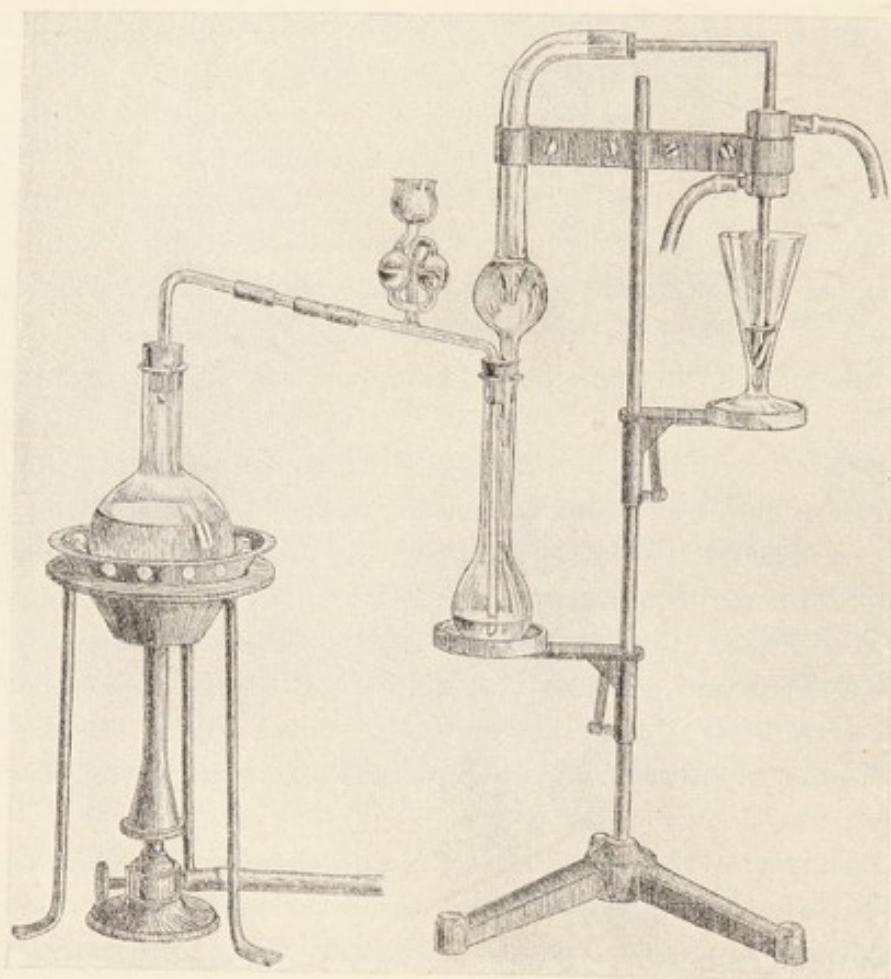
1. Die zur Oxydation der Substanz nötige Menge reiner konzentrierter Schwefelsäure (von Merck) beträgt immer 1 ccm. Sie enthält nur sehr wenig Ammoniak. Beim Stehen kann sie aber viel Ammoniak aus der Luft aufnehmen und ist dann unbrauchbar. Auf Grund mannigfacher Versuche halte ich es für das Beste, aus der Vorratsflasche (immer mit Glasstopfen!) etwa 100 ccm in eine kleinere Flasche, ebenfalls mit Glasstopfen, überzuführen und für jede Bestimmung 1 ccm mittels einer reinen Pipette herauszunehmen. Die Säure bringt man direkt in den Kjeldahlkolben, am besten einen 50 ccm-Standkolben aus Jenaer Glas.

Ein Zusatz von Kaliumsulfat ist überflüssig und aus dem Grunde nicht ratsam, weil es schwierig ist, dasselbe absolut ammoniakfrei zu bekommen. Und selbst, wenn man dies erreicht hätte, so nimmt das Salz beim Stehen doch immer wieder Ammoniak auf. Als Katalysator soll nur Kupfersulfat verwendet werden. Zwei Tropfen einer 10%-igen Lösung desselben genügen. Bei der Bestimmung des Reststickstoffes erübrigt sich der Zusatz eines Katalysators, da die Phosphormolybdänsäure selbst ein vorzüglicher Katalysator ist.

Die Dauer der Oxydation beträgt etwa 5 Minuten nach dem Verdampfen des Wassers. Man soll so lange erhitzen, bis die Flüssigkeit völlig farblos geworden ist oder eine rein grünliche Farbe angenommen hat. Nur die Oxydation bei der Harnstoffbestimmung erfordert mehr Zeit — etwa eine halbe Stunde —, da hier viel organische Substanz — Alkoholrückstände und die Lipoide des Blutes — vorhanden sind.



Das Überdestillieren des Ammoniaks geschieht, nachdem die Aufschlussflüssigkeit alkalisch gemacht worden ist, direkt aus dem Aufschlusskolben. Dies kann selbstverständlich durch Erhitzen desselben bewirkt werden. Indessen hat sich die Verwendung von heissem Wasserdampf besonders gut bewährt und ist aus folgenden Gründen viel angenehmer als das erstere Verfahren. Die Destillation geht schneller vor sich. Sie ist im Laufe von 2 Minuten bei den meistens in Frage kommenden Bestimmungen beendet. Das direkte Erhitzen erfordert regelmässig längere Zeit. Die indirekte De-



Figur 4.

stillation verläuft ruhiger, es tritt kein Stossen ein. Auch braucht man nicht zu befürchten, dass die Flüssigkeit zu stark eingedampft wird, was ein lästiges Stossen und infolgedessen eine Unterbrechung der Analyse zur Folge hat. Schliesslich ist die ganze Apparatur einfacher und bequemer, besonders wenn man — wie es oft vorkommt — eine ganze Reihe von Bestimmungen auszuführen hat.

Wie aus Figur 4 ersichtlich ist, wird der Wasserdampf in einer Kochflasche von 200—300 ccm Inhalt entwickelt. Für gleichmässiges Kochen, was unbedingt notwendig ist, sorgt man durch Zusatz von Siedesteinen. Sehr



empfehlenswerte Siedesteine stellt man sich selbst aus Gips her. Gebrannter Gips wird mit Wasser gemischt und auf einer Glasplatte in einer 2—3 mm hohen Schicht ausgebreitet. Nach dem Trocknen bricht man erbsen- bis bohngrosse Stücke ab: Sie sind porös und leicht und funktionieren deswegen ausgezeichnet. Man muss sie nach jeder Versuchsreihe durch neue ersetzen, indessen sind sie nach dem Trocknen wieder zu gebrauchen.

Der Kochkolben ist mit einem durchbohrten Korkstopfen verschlossen, welcher ein Glasrohr trägt, das mittels eines Gummischlauches mit einem zweiten Glasrohr verbunden ist. Durch dieses zweite Glasrohr wird der Wasserdampf bis auf den Boden des Kjeldahlkolbens geleitet. Dieses Glasrohr ist unten schief abgeschnitten. Der Kjeldahlkolben trägt ausserdem ein Destillationsrohr mit einer Vorrichtung zum Verhüten des Überspritzens der Lauge. Diese nach Hopkins konstruierte Vorrichtung wirkt so ausgezeichnet, dass dieser Übelstand nicht eintritt. Oben ist das Destillationsrohr etwa rechtwinkelig gebogen und mittels Korkstopfens mit einem ebenfalls gebogenen Röhrchen aus Platin, Silber oder Quarz (nicht aus Glas!) verbunden, das einen kleinen kupfernen Kühler trägt. Zu Beginn der Destillation muss das Platinröhrchen, welches gleichfalls unten schief abgeschnitten ist, in die Titriersäure, die sich in einem etwa 20 ccm fassenden Spitzglas befindet, eintauchen. Das Spitzglas steht während der Destillation auf einem Stativ, das mittels einer federnden Einrichtung gehoben und gesenkt werden kann (siehe Figur 4). Sobald das Ammoniak nicht mehr als Gas, sondern als wässrige Lösung übergeht, kann man das Spitzglas senken, die Spitze des Platinrohres mit der Spritzflasche abspülen und — 2 Minuten nach Beginn der Destillation <sup>1)</sup> — mittels Lackmuspapiers prüfen, ob bereits alles Ammoniak übergetrieben ist. Dies ist bei richtiger Ausführung immer der Fall, wenn nicht mehr als 0,1 mg Stickstoff zu bestimmen ist. Zeigt sich keinerlei Andeutung einer Blaufärbung, so lässt man noch 10 Tropfen übergehen und bricht dann die Destillation ab, indem man den Bunsenbrenner wegnimmt und die Verbindung zwischen Koch- und Kjeldahlkolben löst. (Um das heisse Glasrohr bequemer handhaben zu können, ist es mit einem kleinen Stück Gummischlauch überzogen.) Reagieren die übergehenden Tropfen noch alkalisch, so spült man das Lackmuspapier mit Wasser in das Spitzglas ab und setzt die Destillation weiter fort, wobei es gleichgültig ist, ob man dabei das Röhrchen in die Titrierflüssigkeit eintauchen lässt oder nicht.

Um die Lauge in den Kjeldahlkolben einzuführen, ist das Glasrohr, welches zum Einleiten des Wasserdampfes in den Kjeldahlkolben dient, mit einem kleinen Seitenrohr versehen, das durch einen Gummischlauch mit einem kleinen, 3 ccm fassenden Trichter versehen ist. Noch einfacher und eleganter hat sich die Verwendung eines Sicherheits-

<sup>1)</sup> Zur Markierung der Zeit ist eine Sanduhr zu empfehlen.



trichters erwiesen, welcher (siehe Figur 4) in das Glasrohr eingeschmolzen ist<sup>1)</sup>. Da dasselbe bis zum Boden des Kolbens reicht, kann während des Eingiessens von Lauge (und später) kein Ammoniak entweichen, und da die Lauge erst zugesetzt wird, wenn das mit dem Destillationsrohr verbundene Platinröhrchen schon in die Titriersäure taucht, kann auf diesem Wege kein Ammoniak verloren gehen, weil die Lauge eben in ein geschlossenes System eingeführt wird. Daraus erwächst der Vorteil, dass man die Schwefelsäure nur mit wenig Wasser zu verdünnen braucht, und dass man gesättigte Natronlauge verwenden kann. Das in verhältnismässig wenig Flüssigkeit gelöste Ammoniak geht daher um so schneller über, während beim Eingiessen der zähflüssigen, gesättigten Lauge in einen offenen Kolben Ammoniakverluste zu befürchten wären. Auch kann die Verunreinigung des Kolbenhalses mit Lauge ein Abgleiten des Gummistopfens bewirken, und hierdurch wird der Stopfen bald zerstört.

Der Trichter gibt unmittelbar das Mass der notwendigen Menge Lauge an.

Die gesättigte Lauge stellt man sich durch Auflösen von festem Natriumhydroxyd in Wasser dar, wobei man das Ätznatron nach und nach zusetzt. Hierbei darf nur ein mässiges Erwärmen stattfinden, und man muss öfter mit einem Glasstabe umrühren, damit das Natron nicht festbackt. Sobald kein Natron mehr in Lösung geht, wird die dickflüssige Lauge, die viel ungelöstes Natriumkarbonat (das in gesättigter Lauge unlöslich ist) enthält, durch ein Asbestfilter abgesaugt und das klare Filtrat in einer Flasche mit Korkstopfen aufbewahrt. Absolut notwendig ist diese Trennung jedoch nicht, und wenn man das Karbonat absetzen lässt, kann man die verhältnismässig karbonatfreie Lauge einfach abgiessen. Das Natron ist bisweilen nicht unerheblich mit Ammoniak verunreinigt. Elektrolytisch hergestelltes Natron zeigte sich dagegen ganz ammoniakfrei.

Erst nachdem die Lauge zugesetzt ist, wird der Kjeldahlkolben mit dem schon erhitzten Kochkolben verbunden.

Von grosser Wichtigkeit ist, dass der Kochkolben stark erhitzt wird. Nur in diesem Falle geht das Ammoniak rasch über. Im entgegengesetzten Falle geht die Destillation so langsam vor sich, dass man schwer feststellen kann, wann sie beendet ist. Das Ammoniak geht in diesem Falle in so geringen Spuren über, dass man mit Lackmuspapier überhaupt keine Reaktion erhält. Auch muss das Glasrohr für den Wasserdampf bis zum Boden des Kjeldahlkolbens reichen, sonst wird das Ammoniak ebenfalls langsamer ausgetrieben.

Am besten überzeugt man sich durch eine vorherige Destillation mit bekannten Mengen Ammoniak, ob der Apparat richtig funktioniert. Zu diesem Zwecke stellt man sich eine Lösung von Salmiak oder Ammoniumsulfat dar,

<sup>1)</sup> Um Spritzen zu verhindern, enthält der Sicherheitstrichter eine kleine massive Glasperle (siehe Figur 4).



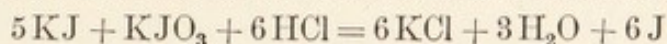
deren Gehalt man am besten durch eine Makrokjeldahlbestimmung feststellt. (Hierzu kann dieselbe Apparatur verwendet werden, nur gibt man in die Vorlage 5—10 ccm n/10-Lauge und bestimmt das Ammoniak azidimetrisch.)

Im Laufe einer Stunde kann man bequem 10 Destillationen ausführen. Nach Beendigung der Destillation giesst man sofort etwas Wasser durch den Sicherheitstrichter, sonst klebt die Glasperle leicht an der Wand des Trichters an. Falls dies passieren sollte, kann man sie jedoch durch Einblasen von Luft in den Trichter wieder loslösen.

Die ganze Apparatur wird vorschriftsmässig von der Firma Grave, Stockholm, hergestellt und geliefert. Die von ausländischen Firmen hergestellten Modelle sind oft minderwertig, da von diesen bisweilen ohne jede Berechtigung und zum Schaden für die richtige Ausführung sogenannte Verbesserungen angebracht worden sind. Trotzdem werden sie unter meinem Namen angepriesen!

Das überdestillierte Ammoniak kann einwandfrei nur auf jodometrischem Wege bestimmt werden. Bei der azidimetrischen Bestimmung macht sich die hydrolytische Dissoziation des Ammoniumsulfats bzw. des Salmiaks so störend geltend, dass man mit keinem Indikator einen scharfen Umschlag bekommt. Auch nicht beim Arbeiten mit kohlenensäurefreien Flüssigkeiten! Während der Neutralisation schlägt die Farbe immer wieder zurück, und man muss nach anfänglicher Neutralisation mehrere Tropfen Lauge zusetzen, bis die Farbe bestehen bleibt. Man muss also ziemlich stark über-titrieren, was bedenklich ist, wenn es sich um Hundertstel und Tausendstel Milligramme handelt.

Demgegenüber befriedigt die jodometrische Stickstoffbestimmung selbst sehr hoch gespannte Anforderungen, und ist für den vorliegenden Zweck durchaus brauchbar, wenn sie auch für die Mikroanalyse etwas abgeändert werden muss. Bekanntlich verläuft die Reaktion nach der Gleichung:



grösstenteils momentan, stellt sich aber schliesslich nur langsam auf ein Gleichgewicht ein. Das Zeitmoment spielt also eine wichtige Rolle. Titriert man unmittelbar nach der Mischung der Salze und der Säure bei Gegenwart von Stärke bis farblos, so erfolgt rasch wieder Blaufärbung.

Ausserdem ist das Flüssigkeitsvolumen von Bedeutung. Arbeitet man mit einem geringeren Volumen, so tritt das Gleichgewicht schneller ein als bei Verwendung eines grösseren.

Aus diesem Grunde ist es wichtig, dass man mit einem soweit wie möglich konstanten Volumen arbeitet und eine bestimmte Zeit nach dem Zusatz des Jodid-Jodatgemisches abwartet. Titriert man zu früh, dann ist die Reaktion noch nicht beendet, und wartet man zu lange, dann geht etwas Jod weg. Dank der Einführung des Spitzglases braucht man ausser der Titriersäure kein Wasser zuzusetzen. Selbst bei Verwendung von 1 ccm Schwefel-



säure taucht die Spitze des Destillationsrohres vollständig in die Säure ein. Weiter ist eine konstante Destillationszeit, nämlich 2 Minuten, vorgeschrieben. Also geht immer eine annähernd gleiche — und dabei kohlenstofffreie — Wassermenge über. Unter diesen Umständen ist die ganze Jodmenge 5 Minuten nach der Mischung der Salze und der Säure in Freiheit gesetzt, nach welcher Zeit die Titration auszuführen ist. Wartet man länger, dann geht Jod verloren. Dieser Übelstand lässt sich aber auch vermeiden. Ein Überschuss von Jodkalium verhindert das Entweichen des Jods, wie folgender Versuch zeigt: 1 ccm n/200-Jodlösung wurde im Spitzglas mit 10 ccm Wasser verdünnt. Bei der unmittelbar darauf erfolgten Titration wurden 0,98, 0,98 und 0,99 ccm n/200-Thiosulfatlösung verbraucht. Nach 15 Minuten langem Stehenlassen aber nur 0,92 und nach einer halben Stunde nur 0,87, 0,88 und 0,89 ccm. Dieselbe Jodmenge, mit 8 ccm Wasser und 2 ccm 5%-iger Jodkaliumlösung versetzt, verbrauchte nach einer halben Stunde 0,96 ccm Thiosulfatlösung. Aber schon durch Auflegen eines Uhrglases auf das Spitzglas kann man die Verflüchtigung des Jods verhindern. So wurden für eine Mischung von 1 ccm der Jodlösung mit 10 ccm Wasser ohne Zusatz von Jodkalium nach halbstündigem Stehen im Spitzglas mit aufgelegtem Uhrglas 0,99, 0,96 und 0,96 ccm und unter Zusatz von 2 ccm Jodidlösung, aber sonst unter gleichen Bedingungen, 0,99, 0,99 und 0,99 ccm Thiosulfatlösung verbraucht.

Folglich soll man immer 2 ccm 5%-ige Jodkaliumlösung, die auch nach mehrtägigem Stehen nicht die geringste Gelbfärbung zeigen darf, zusetzen und dann ein Uhrglas über das Spitzglas legen. Weiter muss Jodatlösung zugesetzt werden. Es wurde früher empfohlen, 0,1 ccm einer 4%-igen Kaliumjodatlösung zu verwenden. Bequemer ist jedoch, das Jodat mit der Titriersäure zusammen zuzusetzen. Man stellt sich das Gemisch her, indem man 5,0 ccm n/10- $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 20 ccm n/10- $\text{KJO}_3$  in einen 100 ccm-Messkolben gibt und mit Wasser bis zur Marke auffüllt. (Das Jodat muss selbstverständlich vollständig neutral reagieren.)

Etwa 5 Minuten nach dem Zusatz der 2 ccm Jodidlösung setzt man 2 Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert bis farblos. Nach einer Viertelstunde fängt die Flüssigkeit an nachzublauen, was jedoch nicht berücksichtigt wird. Sollte dagegen in den ersten Minuten nach der Titration eine solche Nachbläuung eintreten, so muss man die Titration weiter fortsetzen und den nachträglichen Verbrauch zu dem ersten zuzählen.

Wie aus der Gleichung hervorgeht, wird eine dem Überschuss an Säure äquivalente Menge Jod in Freiheit gesetzt und letztere durch Titration mit Thiosulfatlösung ermittelt. Die Differenz zwischen der vorgelegten Menge Säure und der verbrauchten Thiosulfatlösung entspricht, falls dieselben gleiche

<sup>1)</sup> Bei Verwendung von kohlenstofffreiem Wasser hält sich die Jodlösung besser.



Normalität besitzen, der vorhandenen Menge Ammoniak, ausgedrückt in derselben Normalität.

Es ist für die meisten Bestimmungen erforderlich, das Ammoniak mit einer Genauigkeit von 0,001—0,003 mg, berechnet auf Stickstoff, zu bestimmen. Bei Verwendung von n/100-Lösungen von Säure und Thiosulfat entspricht ein Tropfen von 0,02 ccm 0,0028 mg Stickstoff, was genügt. Wünschenswert ist es jedoch, eine noch grössere Genauigkeit zu erzielen. Tatsächlich gibt auch ein Tropfen (0,02 ccm) einer n/200-Thiosulfatlösung einen genügend scharfen Farbenumschlag. Sogar bei 0,01 ccm n/200-Thiosulfatlösung ist der Umschlagspunkt unzweideutig. Infolgedessen sollen n/200-Lösungen von Säure und Thiosulfat zur Verwendung kommen. Zum Abmessen der Säure muss man sich, um Ungenauigkeiten zu vermeiden, einer Vollpipette von 1 bzw. 2 ccm bedienen. Der Fehler im Abmessen beträgt dann kaum 0,01 ccm, entsprechend 0,0007 mg Stickstoff. Die Thiosulfatlösung muss man selbstverständlich aus einer Bürette zufließen lassen. Die n/200-Thiosulfatlösung kann man entweder vorrätig halten. In diesem Falle verdünnt man 50 ccm n/10-Thiosulfatlösung mit ausgekochtem und durch ein Natronkalkrohr vor der Kohlensäure der Luft geschützten Wasser auf 1 Liter, setzt den Stopfen auf und schüttelt sachte um. Inzwischen hat man eine braune 1-Literflasche mit einem doppelt durchbohrten Stopfen versehen, die ein Natronkalkrohr und ein dünnes, bis zum Boden der Flasche reichendes Glasrohr trägt, welches oben umgebogen und luftdicht mit einer in  $\frac{1}{20}$  ccm geteilten 10 ccm-Bürette verbunden ist. Die Bürette ist zum Schutz vor der Aussenluft gleichfalls mit einem Natronkalkrohr versehen. Dieses zweite Natronkalkrohr trägt einen Gummischlauch, durch den man die Thiosulfatlösung in die Bürette einsaugen kann. Ein Quetschhahn zwischen der Vorratsflasche und der Bürette verhindert, dass die Lösung zurücksteigt. Die Bürette ist mittels eines Metallbügels an dem Flaschenhals befestigt. Nachdem die Thiosulfatlösung in die Flasche übergeführt worden ist, dichtet man überall mit festem Paraffin ab, so dass die Luft nur durch die Natronkalkröhren mit der Lösung in Berührung kommen kann. Die Bürette soll immer mit Thiosulfatlösung gefüllt sein. In dieser Weise bereitete und aufbewahrte Thiosulfatlösung hält ihren Titer gewöhnlich recht lange unverändert bei. Leider kommt es aber gelegentlich vor, dass der Titer sich rasch verändert. Es hat den Anschein, dass die Zersetzung, sobald sie einmal angefangen hat, immer rascher fortschreitet. Die Kohlensäure ist nicht die Veranlassung hierfür. Dagegen macht es den Eindruck, als ob die Gegenwart eines Katalysators die Zersetzung beschleunigt. Füllt man die Flasche mit neubereiteter Thiosulfatlösung, ohne erstere vorher zu reinigen, so ändert sich der Titer rasch. Ist die Flasche aber vorher gründlich gesäubert, so bleibt der Titer meistens monatelang unverändert. Selbstverständlich kann man die n/200-Thiosulfatlösung in geringeren Mengen für den augenblicklichen Gebrauch auch frisch bereiten; in diesem



Falle bedient man sich einer Mikrobürette. Tatsächlich ist eine solche Lösung, wenn man für ihre Darstellung kohlensäurefreies Wasser benutzt, mindestens drei Tage unverändert haltbar, wenn sie in einer Flasche mit Glasstopfen aufbewahrt wird. Da eine  $n/10$ -Thiosulfatlösung lange unverändert haltbar ist, ist die Darstellung der  $n/200$ -Thiosulfatlösung in dieser Weise vielleicht ebenso bequem. Kohlensäurefreies Wasser stellt man sich so her, dass 3—4 Liter destilliertes Wasser in einem entsprechenden Kolben eine halbe Stunde gekocht werden. Der Kolben wird dann augenblicklich mit einem Stopfen, der sowohl ein Natronkalkrohr als auch eine Hebevorrichtung trägt, verschlossen.

Gegenüber der Thiosulfatlösung besitzt arsenige Säure gewisse Vorteile. Eine  $n/10$ -Lösung derselben ist unverändert haltbar. Nach Verdünnung auf  $n/200$  hält sich die Lösung mindestens eine Woche unverändert. Bekanntlich muss aber die bei der Titration gebildete Arsensäure neutralisiert werden, aus welchem Grunde man Natriumbikarbonat oder in neuerer Zeit Dinatriumphosphat zusetzt. Zweckmässig hat sich folgende Anordnung erwiesen: 10 g Dinatriumphosphat (nach Sörensen mit 2 Molekülen Kristallwasser), 1 ccm 25%-ige Salzsäure und 5 ccm  $n/10$ -Arsenigsäurelösung bringt man in einen 100 ccm-Messkolben. Nach Zusatz von Wasser bis zu vollständiger Auflösung des Phosphates füllt man mit Wasser bis zur Marke auf und schüttelt um <sup>1)</sup>. Diese Lösung wird in die Mikrobürette übergeführt. Die Vorteile derselben gegenüber Thiosulfat sind folgende: Sie ist länger haltbar. Kohlensäure wirkt nicht auf sie ein. Sie behält den richtigen Titer bei, während sich die Thiosulfatlösung oft verändert. Schliesslich ist der Endpunkt noch schärfer zu erkennen als bei Thiosulfat, da die blaue Färbung bis zum Umschlag stärker hervortritt. Auf der anderen Seite verläuft die Reaktion bei Thiosulfat rascher als bei Arsenik. Man muss mit letzterem folglich etwas langsamer titrieren. Dies ist jedoch bei einiger Übung nicht von Bedeutung. Da die Arsenigsäurelösung überhaupt weniger Vorsicht erfordert und, wie gesagt, haltbarer ist, verdient sie vielleicht den Vorzug.

Die Stärkelösung wird in folgender Weise bereitet. 1 g lösliche Stärke wird in einem Proberöhrchen mit etwa 10—15 ccm heissem Wasser übergossen. Nachdem man umgeschüttelt hat, erhitzt man vorsichtig über freier Flamme, bis alles gelöst ist. Darauf verdünnt man unmittelbar mit gesättigter Kaliumchloridlösung auf 100 ccm, schüttelt um und filtriert eventuell. Diese Stärkelösung ist haltbar. Doch darf sie nur so lange verwendet werden, als sie mit einem Tropfen sehr verdünnter Jodlösung rein blaue Farbe gibt. Nach längerem Stehen erhält man mit derselben eine violette bis rotviolette Farbe; in diesem Falle ist sie nicht mehr brauchbar. Die Berechnung ist sehr einfach: Die Differenz zwischen der vorgelegten Säuremenge

<sup>1)</sup> Noch praktischer ist es jedenfalls, die mit Salzsäure versetzte Phosphatlösung vorrätig zu halten und die Arseniklösung einfach damit zu verdünnen.



und der verbrauchten Menge Thiosulfat, bzw. Arsenik in ccm, mit 0,07 multipliziert, entspricht dem Stickstoffgehalt in mg, wovon die durch den blinden Versuch in den Reagenzien gefundene Stickstoffmenge abzuziehen ist. Gewöhnlich entspricht dieselbe etwa 0,10 ccm Säure = 0,007 mg N.

Infolge der oben besprochenen Vorsichtsmassregeln sind die Versuchsfehler bei Verbrennung, Destillation und Titration auf ein Minimum reduziert. Ein Versuchsfehler muss aber noch berücksichtigt werden, nämlich die Verunreinigung der Reagenzien und Geräte mit aus der Luft stammendem Ammoniak. Dieser Versuchsfehler erreicht bisweilen eine solche Höhe, dass er die Analyse vollständig unbrauchbar machen kann. Glücklicherweise ist diese Fehlerquelle nicht schwer zu vermeiden, wenn man ihr einige Aufmerksamkeit schenkt.

In chemischen Laboratorien bemerkt man, dass Geräte, die einige Zeit an der Luft gestanden haben, mit einer feinen, grauen Staubschicht bedeckt sind. Der Staub besteht grösstenteils aus Salmiak. Das Ammoniak und die Salzsäure, welche die Luft verunreinigen, verbinden sich zu feinen Teilchen von Salmiak, die nach und nach jede freie Oberfläche bedecken. Alle Kolben, Destillationsapparate, Pipetten, Bechergläser, Reagenzgläser, ebenso alles Filtrierpapier enthalten nach einiger Zeit eine feine Schicht von Salmiakstaub. Ursprünglich stickstofffreies Papier gibt auch nach Aufbewahrung in einer Schublade nach recht kurzer Zeit eine positive Nesslersche Reaktion, sogar auch dann, wenn es in Schachteln oder Gefässen mit Glasdeckeln aufbewahrt wird. Auch der Inhalt von mit Korkstopfen verschlossenen Flaschen wird nach und nach ammoniakhaltig, und sogar in destilliertem Wasser, das in einem Glasballon mit Hebevorrichtung aufbewahrt wurde, konnte nach einiger Zeit Ammoniak nachgewiesen werden.

Zur Verhütung dieser Verunreinigung muss man vor allem die Zimmerventilation fördern. Ferner öffne man in dem Arbeitszimmer und in seiner Nähe keine Ammoniakflasche. Im hiesigen Krankenhause haben sich Schachteln mit Filtrierpapier für die Blutanalyse lange Zeit unverändert ammoniakfrei erhalten, während sie im hiesigen Laboratorium schon nach 14 Tagen stark ammoniakhaltig geworden waren. Das Laboratorium ist allerdings schlecht ventiliert und befindet sich in der Nähe des Laboratoriums für Studierende.

Die Luft, die mit dem destillierten Wasser und den Lösungen in Berührung kommt, soll einen nicht zu kleinen Wattebausch passieren; dadurch allein bleiben die Flüssigkeiten monatelang ammoniakarm. Schliesslich sollen sämtliche Geräte wie Reagenzgläser, Kjeldahlkolben usw. kurz vor dem Gebrauche (1—2 Tage vorher genügt) mit destilliertem Wasser sauber gemacht werden. Der Destillationsapparat muss täglich einmal vor dem Gebrauche durch strömenden Wasserdampf gereinigt werden. Man versäume auch nicht, den Trichter des Destillationsapparates vor dem Gebrauch mit Wasser zu spülen. Man benutze überhaupt keinen Gegenstand, der einige Zeit an der



Laboratoriumsluft gestanden hat, ohne vorherige Reinigung und achte immer darauf, dass die Flaschen mit Lösungen nicht offen stehen bleiben. Die Papiere zur Blutanalyse müssen öfter mit Nessler's Reagens geprüft werden. Überhaupt hat man in der Nessler'schen Reaktion ein einfaches Mittel zur Kontrolle aller Geräte und Reagenzien auf Reinheit. Und so ist diese Fehlerquelle, wenn man erst einmal auf sie aufmerksam gemacht ist, unschwer zu vermeiden.

### Die Ausführung der Stickstoffbestimmung.

Nach Überführung des zu analysierenden Stoffes — am besten in gelöstem Zustande — in einer Menge, die für gewöhnliche Bestimmungen einige Hundertstel Milligramme Stickstoff enthalten darf, in einen gereinigten 50 ccm fassenden, langhalsigen Kjeldahlstehkolben setzt man 1 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure hinzu. Enthält die Lösung der zu analysierenden Substanz an und für sich keinen Katalysator, so setzt man ausserdem ein paar Tropfen 10%-iger Kupfersulfatlösung hinzu. Man erhitzt nun anfangs vorsichtig, bis alles Wasser verjagt ist, und später etwas stärker, bis die Lösung farblos oder rein grüngefärbt erscheint. Dann lässt man erkalten, setzt etwa 10 ccm Wasser hinzu und schüttelt einige Male um, bis sich eine eventuell gebildete Ausscheidung wieder gelöst hat. Inzwischen wird durch den Destillationsapparat behufs Reinigung ein Wasserdampfstrom hindurchgeleitet. Ist dies geschehen, so wird ein kleines Spitzglas von etwa 20 ccm Inhalt mit 1 ccm  $n/200$ -Schwefelsäure oder eventuell mehr unter das Abflussrohr des Apparates gestellt. Die Spitze des Rohres soll in die Titriersäure eintauchen.

Der Kjeldahlkolben wird jedoch erst, nachdem er vollständig erkaltet ist, mit dem Destillationsapparat verbunden und die bewegliche Stativplatte darunter befestigt. Nun wird Natronlauge (3 ccm genügen) durch den Trichter einlaufen gelassen und die Verbindung des Kjeldahlkolbens mit dem vorher erhitzten Kochkolben, der mit destilliertem, angesäuertem Wasser dreiviertels voll gefüllt ist, hergestellt. Ein paar Siedesteine sind gleichfalls vorher in den Kochkolben eingeworfen worden. Die Wasserleitung zu dem kleinen Kühler wird vorher geöffnet und möglichst stark gekühlt. Jetzt wird der Brenner unter den Kochkolben gestellt, und der Inhalt desselben bis zu lebhaftem Sieden erhitzt. Nach zwei Minuten langem Sieden senkt man das Spitzglas, bis die Spitze des Abflussrohres leicht zugänglich geworden ist, spritzt diese mittels der Spritzflasche ab und prüft mit Lackmuspapier, ob alles Ammoniak übergegangen ist. Ist dies nicht der Fall, so spritzt man das Lackmuspapier in das Spitzglas ab, lässt noch 10 Tropfen übergehen, nimmt dann den Brenner weg und öffnet die Verbindung zwischen Destillationsapparat und Kochkolben. Wird das Lackmuspapier auch dann



noch blaufärbt, so spritzt man es ab und setzt die Destillation fort, wobei die Spitze nicht mehr in die Säure einzutauchen braucht.

Zum Destillat setzt man 2 ccm 5%-iger Kaliumjodidlösung (und eventuell 0,1 ccm (2 Tropfen) 4%-iger Kaliumjodidlösung) und 5 Minuten später 2—3 Tropfen der Stärkelösung. Schliesslich titriert man mit n/200-Thio-sulfatlösung oder Arseniklösung bis farblos. Tritt bei Verwendung von Thio-sulfat im Laufe von 5—10 Minuten ein Nachbläuen ein, so muss die Titration fortgesetzt werden <sup>1)</sup>).

### Die Bestimmung des Reststickstoffes.

Der physiologische Gehalt des Blutes an Reststickstoffen beträgt etwa 20—35 mg in 100 g Blut. 100 mg Blut enthalten folglich 0,02—0,035 mg Reststickstoff, eine Menge, die sich mit einem Fehler von etwa 10% nach der Mikromethode bestimmen lässt. Da dieser Fehler recht wenig bedeutet, kann man sich mit einer Analyse begnügen. Besser ist es jedoch immer, die Analysen doppelt auszuführen und dies um so mehr, als zwei Analysen nur unbedeutend mehr Zeit erfordern als eine.

Die Voraussetzung der ganzen Methode ist eine exakte Trennung des Reststickstoffes von dem Bluteiweiss. Es ist infolgedessen notwendig, dass das zu diesem Zweck angewandte Reagens das Eiweiss absolut quantitativ ausfällt, und dass andererseits die Extraktivstoffe vollständig in Lösung gehen. Die erste Forderung ist, soweit es sich um die gewöhnlichen Eiweisskörper des Blutes, Hämoglobin, Albumin und Globulin handelt, leicht zu erfüllen. Ganz anders verhalten sich aber die Albumosen und Peptone, welche von Quecksilberchlorid in salzsaurer Lösung, von Metaphosphorsäure und von Trichloressigsäure sowie durch Kochen gar nicht oder nur unvollständig ausgefällt werden. Da die genannten Reagenzien auch heute noch für Mikrobestimmungen verwendet werden, sind allein aus diesem Grunde die meisten der letzteren ganz wertlos. Denn Albumosen kommen recht häufig im Blute vor. Die Angaben über das normale Vorhandensein von 50—100 mg Reststickstoff im Blut finden zum Teil dadurch ihre Erklärung. Tatsächlich haben eingehende Versuche im hiesigen Laboratorium gezeigt, dass nur zwei Fällungsmittel alle berechtigten Forderungen erfüllen, nämlich Phosphormolybdänsäure in schwefelsaurer Lösung sowie Uranylazetat (bzw. -chlorid). Vollständig gleichwertig sind sie zwar nicht, da bald das eine, bald das andere Fällungsmittel zu geringe Werte erzielen lässt. In bezug auf die Abscheidung von Albumosen und Peptonen war die Phosphormolybdänsäure dem Uranylazetat überlegen. Echte Peptone werden jedoch auch von diesen beiden Reagenzien nicht vollständig gefällt. Höchst-

<sup>1)</sup> Handelt es sich um Stickstoffmengen von 0,5—2,0 mg, so verwendet man besser 1 bis 2 ccm n/10-Säure als Vorlage und bestimmt schliesslich den Stickstoff azidimetrisch mit Methylrot als Indikator.



wahrscheinlich kommen aber echte Peptone in nennenswerter Menge im Blute nicht vor. Andererseits haben Versuche mit Aminosäuren (und Diaminosäuren) ergeben, dass dieselben von Phosphormolybdänsäure unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht gefällt werden.

Die Phosphormolybdänsäure wird in Form einer 0,5%-igen Lösung verwendet. Der Schwefelsäuregehalt des Reagenzes soll 1,5% betragen. Obwohl hierdurch die Eiweisskörper quantitativ gefällt werden, haften dieselben schlecht an dem Papier. Ein Zusatz von 0,5% Natriumsulfat verhindert diesen Übelstand. Schliesslich werden auf 2 Liter Lösung 0,5 g Traubenzucker zugegeben. Der Zucker verkohlt, und bei der Verbrennung der Kohle wird fortwährend Wasser gebildet, welcher Umstand die Ammoniakbildung befördert. Ein Liter der Extraktionsflüssigkeit enthält also:

5 g Phosphormolybdänsäure, 15 g Schwefelsäure, 5 g Natriumsulfat und 0,25 g Dextrose.

Darstellung der Extraktionsflüssigkeit: Man geht am besten vom phosphormolybdänsauren Natrium aus. Das Salz ist jedoch immer ammoniakhaltig. Deswegen werden 10 g desselben und 10 g Glaubersalz mit etwa 150 ccm Wasser unter Zusatz von 15—20 Tropfen 25%-iger Natronlauge in einer Porzellanschale zum Kochen erhitzt und 15 Minuten im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten bringt man die Salzlösung in einen 2-Liter-Messkolben, spült mit Wasser nach und fügt vorsichtig 30 g konzentrierte Schwefelsäure (Merck) hinzu. Schliesslich werden 0,5 g Traubenzucker zugegeben. Man füllt am besten mit frisch destilliertem Wasser bis zur Marke auf und giesst die Lösung in eine Flasche mit Hebevorrichtung oder mit Abflusshahn. Um vor Verunreinigungen aus der Luft zu schützen, lässt man die Luft vor ihrem Zutritt zur Flasche einen Wattebausch oder Wasser passieren.

Die zur Bestimmung des Reststickstoffs benutzten Papierstückchen werden, wie S. 12 angegeben, vorbereitet.

Für den Fall, dass man die Lösung nach der Extraktion des Blutes filtrieren will, benutzt man einen kleinen, 3 ccm fassenden Trichter und wäscht das Filter 3—4 mal mit destilliertem Wasser aus. Falls das Filter nicht zu stark mit Salmiak verunreinigt war, ist es nun ammoniakfrei geworden. Da die Filtration und das Auswaschen nur ganz kurze Zeit und nicht mehr Flüssigkeit erfordert, habe ich bei Blutanalysen in der Regel eine solche Filtration vorgenommen. Man hat dann die unbedingte Gewissheit, dass keine Spur von Eiweiss mitgerissen worden ist.

### Die Ausführung der Mikrobestimmung.

100—120 mg Blut werden in ein Papierstückchen von bekanntem Gewicht eingesaugt und gewogen. Dann lässt man das Papier etwa 5 Minuten



an der Luft trocknen, bringt es in ein reines, trockenes Proberöhrchen und setzt so viel von der Phosphormolybdänlösung zu, dass dieselbe 3—4 mm über dem Papier steht. Je höher die Flüssigkeit über dem Papier steht, um so besser haftet das Eiweiss. Möglichst engwandige Proberöhrchen sind deswegen vorzuziehen. Nach mindestens einstündigem Stehen ist die Extraktion beendet, und die Lösung kann in den Kjeldahlkolben übergeführt werden. Doch kann man auch 24 Stunden warten. Zuvor prüfe man jedoch, ob keine Eiweissteilchen losgerissen sind. Hierauf ist auch nach dem Abgiessen der Lösung genau zu achten, da sich Eiweisspartikelchen während des Dekantierens von dem Papier lostrennen können. Gegebenenfalls muss man filtrieren. Nach dem Abgiessen der Lösung setzt man ungefähr die gleiche Menge destillierten Wassers zu dem Papier und giesst sofort auch dieses in den Kolben über, gegebenenfalls unter Filtration. Nach Zusatz von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure schüttelt man um und erhitzt zunächst mit kleiner Flamme, bis alles Wasser verjagt ist, und darauf etwas stärker. Wenn vollständige Entfärbung eingetreten ist, lässt man abkühlen und setzt etwa 10 ccm destilliertes Wasser hinzu. Nachdem das Gemisch wiederum erkaltet ist, fängt man mit der Destillation an. Auf Zusatz von Lauge zur Flüssigkeit im Kjeldahlkolben soll dessen Inhalt vorübergehend gelb und später farblos werden. Bleibt die Gelbfärbung bestehen, so ist dies ein Zeichen dafür, dass zu wenig Lauge zugesetzt worden ist. Ist der Inhalt des Kjeldahlkolbens beim Zusatz der Lauge noch warm, dann tritt eine so starke Wärmeentwicklung ein, dass derselbe plötzlich in die Titriersäure überkochen kann. Gewöhnlich braucht man nur 1—2 ccm  $n/200$  Schwefelsäure vorzulegen, bei höherem Reststickstoffgehalt entsprechend mehr. Glaubt man, dass die Säure nicht ausgereicht hat, so setzt man nach beendigter Destillation einen Tropfen Methylrotlösung hinzu. Schlägt dabei die Farbe in gelb um, dann muss mehr Säure zugesetzt werden. Nach Zusatz von Jodid wird die Titration jodometrisch zu Ende geführt, wobei der Farbumschlag nicht von blau in farblos, sondern in gelb übergeht.

Bei der Berechnung des Analysenergebnisses muss man stets den durch blinde Versuche, die mindestens einmal wöchentlich ausgeführt werden sollen, gefundenen Gesamtstickstoffgehalt des Papiers und der Lösungen als Korrektur anbringen. Diese Korrektur betrug bei uns etwa 0,10 ccm  $n/200$ -Schwefelsäure, oft auch etwas mehr.

### Die Mikrobestimmung des Harnstoffs.

Die qualitativ und quantitativ wichtigsten Bestandteile unter den stickstoffhaltigen Extraktivstoffen des Blutes sind die Aminosäuren und der Harnstoff. Ihre physiologische Bedeutung ist aber durchaus verschieden.



Aminosäuren sind die wichtigsten Abbauprodukte der stickstoffhaltigen Nährstoffe des Blutes, Harnstoff ist das wichtigste Endprodukt bei der Verbrennung dieser Nährstoffe. Die Aminosäuren werden durch das Blut zu den Zellen hingeführt, der Harnstoff wird durch das Blut entfernt. Die Bestimmung des gesamten Extraktivstickstoffs allein, die beide Gruppen umfasst, gestattet demnach keinen tieferen Einblick in den Eiweissstoffwechsel, sofern es sich nicht um besondere Verhältnisse handelt, unter denen eine bedeutende und einseitige Vermehrung der einen oder der anderen Komponente stattgefunden hat. Dies ist jedoch fast immer bei der klinischen Verwendung der Methode der Fall. Für die Untersuchung des Blutes von Patienten mit Nephritis ist es praktisch gleichgültig, inwieweit man den genannten Reststickstoff oder den Harnstickstoff allein bestimmt. Eine Vermehrung des Reststickstoffs lässt in diesem Fall auf eine Vermehrung des Harnstoffgehaltes schliessen. Da die Bestimmung des Reststickstoffes viel weniger Zeit erfordert als die Harnstoffbestimmung, eignet sich die erstere entschieden besser für klinische Untersuchungen. Nichtsdestoweniger ist es für viele Zwecke erwünscht, die Mikrobestimmung des Gesamt-Reststickstoffes mit einem Verfahren zu verbinden, das den Harnstoff und die Aminosäuren getrennt zu ermitteln gestattet. Ein solches Verfahren ist in Anlehnung an die von Mörner und Sjöquist angegebene Methode zur Harnstoffbestimmung im Urin ausgearbeitet worden.

Um den Harnstoff von den übrigen Blutbestandteilen quantitativ zu trennen, hat sich die Extraktion mit einer Mischung von gleichen Teilen absoluten Alkohols und Äthyläther (pro narcosi) als geeignet erwiesen. Die Löslichkeit des Harnstoffes in diesem Gemisch ist zwar gering, aber sie reicht für den vorliegenden Zweck vollkommen aus, da 10 ccm 132 mg Harnstoff zu lösen vermögen. Von den übrigen Bestandteilen des Blutes sind die Aminosäuren und die meisten Harnbestandteile, die zudem in sehr geringer Menge vorkommen, in der Mischung vollkommen unlöslich. Dagegen gehen die Phosphatide des Blutes quantitativ über; der gesamte in ihnen vorhandene Stickstoff beträgt jedoch kein Tausendstel-Milligramm.

### **Die Ausführung der Harnstoffbestimmung.**

So einfach diese Bestimmung auch im Prinzip ist, so muss man bei der praktischen Ausführung doch bestimmte Einzelheiten sorgfältig berücksichtigen, um gewisse Schwierigkeiten zu umgehen. Nachdem die Blutproben in das Papier eingesaugt, gewogen und in Proberöhrchen gebracht worden sind, setzt man gleich so viel Ätheralkohol hinzu, dass die Flüssigkeit einige Millimeter über dem Papier steht. Dann verschliesst man das Röhrchen mit einem Stopfen und lässt es mindestens 5, besser jedoch 24 Stunden stehen. Die Diffusion des Harnstoffes geht sehr langsam vonstatten. Hat



man mehr als etwa 130 mg Blut abgewogen, dann verläuft die Extraktion überhaupt nicht ganz quantitativ! Nach dem Stehen giesst man die Lösung in einen 50 ccm-Kjeldahlkolben, wäscht mit einigen ccm Äther-Alkohol nach und bringt auch diese in den Kolben. Nach Zusatz von 5—6 ccm Wasser, 2—3 Tropfen 10%-iger Kupfersulfatlösung und 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure wird der Kolben in ein Wasserbad gestellt und hier so lange erhitzt, bis der Äther-Alkohol verdunstet ist. Falls das Wasserbad schon vorher erwärmt war, muss man darauf achten, dass der Äther-Alkohol nicht überkocht. Wenn der Inhalt nur noch schwach nach Alkohol riecht, erhitzt man den Kolben anfangs vorsichtig, später, wenn Verkohlung eingetreten ist, stärker, bis der Inhalt eine reine grüne Farbe angenommen hat. Nach Zusatz von etwa 10 ccm Wasser kann man mit der Destillation beginnen. Hat man das Zusetzen von Wasser unterlassen, dann wird viel Äthylschwefelsäure gebildet. Dementsprechend tritt eine so starke Verkohlung ein, dass alle Schwefelsäure verbraucht und die Analyse infolgedessen ungültig wird. Die Verkohlung ist aber auch an und für sich nach Zusatz von Wasser so bedeutend, dass die Verbrennung eine ansehnliche Zeit fordert. Um die Bildung von Äthylschwefelsäure möglichst einzuschränken, kann man mit Vorteil nach Überführung des Äther-Alkohols in den Kjeldahlkolben statt der früheren Vorschrift einen Tropfen einer Mischung von 10 g Kupfersulfat in 100 ccm 20%-iger Schwefelsäure zusetzen und nun den Äther-Alkohol im Wasserbade verjagen, was ausserdem weniger Zeit erfordert, als wenn erst Wasser zugesetzt wird. Nachher setzt man 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure sowie einige ccm Wasser hinzu und verbrennt über freier Flamme. Jetzt verläuft die Verbrennung viel schneller. Von den gefundenen Werten hat man die Korrektur für den Stickstoffgehalt der Lösungen einschliesslich des Äther-Alkohols abzuziehen.

### Die Mikrobestimmung der Aminosäuren.

Wenn die Papiere nach Behandlung mit Äther-Alkohol mit der Phosphormolybdänsäurelösung extrahiert werden, gehen die Aminosäuren in die Lösung über und können dann wie gewöhnlich bestimmt werden. Eine Extraktionszeit von einer Stunde genügt, doch kann man auch länger extrahieren. Tatsächlich gehen nicht nur die Aminosäuren allein, sondern auch alle übrigen stickstoffhaltigen Extraktivstoffe, die in Äther-Alkohol unlöslich sind, in die Phosphormolybdänsäurelösung über. Gewöhnlich aber repräsentieren alle diese zusammen nur einen verhältnismässig geringen Bruchteil des Aminosäurenstickstoffs. Bisweilen, besonders bei Nephritis, können sie jedoch eine recht bedeutende Rolle spielen. Man kann diesem Umstand dadurch Rechnung tragen, dass man statt von Harnstoff und von Aminosäuren, besser von einer Harnstoff- bzw. Aminosäurenfraktion spricht.



## Die Bestimmung des präformierten Ammoniaks.

(Von Dr. Poul Iversen.)

Trotzdem der Ammoniakgehalt des Blutes nur etwa 0,4 mg Stickstoff in 100 g Blut entspricht, ist es Iversen gelungen, ein Verfahren auszuarbeiten, welches zufriedenstellende Werte liefert.

Das Blut wird durch Papierstückchen von gleicher Form, wie sie für die Jodbestimmung verwendet werden, aufgesaugt. Man stellt sich 50 derselben, jedes von etwa 250 mg Gewicht, her, bringt sie in ein Becherglas und übergiesst mit etwa 300 ccm destilliertem Wasser von 50—70°. Nach 15 Minuten giesst man das Wasser ab, fügt neue 300 ccm Wasser und 1 ccm etwa 16%-iger Kalilauge hinzu und kocht ein paar Minuten. Nun giesst man wieder ab und wäscht die Papierstückchen erst mit schwach angesäuertem und dann mit reinem Wasser aus. Dann werden sie in einem Vakuumapparat getrocknet und im Exsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt.

Nach Aufsaugen des Blutes werden die Papiere mit ungefähr derselben Uransalzlösung, wie sie für die Zuckerbestimmung Anwendung findet (siehe S. 30), extrahiert. Dieselbe muss vollständig ammoniakfrei sein und wird in folgender Weise hergestellt: 200 g Kaliumchlorid werden in zwei 1-Liter-Kolben verteilt. In jeden Kolben gibt man etwa 500 ccm Wasser, 20 ccm 16%-ige Kalilauge und ein paar Tropfen Phenolphthalein. Nachdem sich das Salz unter Erwärmen gelöst hat, wird filtriert und das Filtrat etwa 15 Minuten gekocht, abkühlen gelassen und mit Salzsäure neutralisiert. Darauf werden noch 1,5 ccm 25%-iger Salzsäure zugesetzt. Von dem Uranylchlorid werden 3 g in etwa 200 ccm Wasser gelöst und filtriert. Das Filtrat wird nach Zusatz von einigen Kubikzentimetern Kalilauge etwa 10 Minuten gekocht und das ausgeschiedene Uranoxyd durch Dekantation ausgewaschen, auf einem Filter gesammelt und hier mit zirka 20 ccm verdünnter Salzsäure übergossen. Das Filtrat wird so oft auf das Filter gegossen, bis vollständige Lösung eingetreten ist. Die klare, gelb gefärbte Lösung wird auf dem Wasserbade eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit der Kaliumchloridlösung vereinigt. Schliesslich wird das Ganze mit Wasser auf 1 Liter ergänzt. 20 ccm dieser Flüssigkeit und 20 ccm destilliertes Wasser sollen bei einem blinden Versuch zusammen höchstens 0,20 ccm n/300-Thiosulfatlösung verbrauchen.

Zur Destillation des Ammoniaks wird folgender Apparat verwendet: Ein 300-ccm-Rundkolben, der einen doppelt durchbohrten Gummistopfen trägt, wird in ein Wasserbad von 40° C gestellt. Durch die eine Bohrung des Gummistopfens geht ein oben umgebogenes Glasrohr, das bis zum Boden des Kolbens reicht. Ausserhalb des Kolbens ist es — wie bei dem Apparat für die Mikrokjeldahlbestimmung — mit einem kurzen seitlichen Ansatz versehen, der mittels eines dickwandigen Gummischlauchs einen kleinen Trichter



trägt. Ein anderer dickwandiger Gummischlauch verbindet das Rohr mit einer Waschflasche mit Schwefelsäure. Beide Gummischläuche sind mit Quetschhähnen versehen. Durch die zweite Bohrung des Gummistopfens führt ein Glasrohr, welches unmittelbar unter dem Stopfen endigt. Es geht oben in einen Tropfenfänger und dann in ein etwa 30 cm langes Kühlrohr über. Mittels eines kleinen Gummischlauches wird es mit einem Glasrohr, das zu der Vorlage führt, verbunden. Diese Vorlage bildet ein 100-ccm-Rundkolben, welcher während der Analyse in Eiswasser steht. An diese schliesst sich eine zweite Vorlage, die mit der Saugpumpe in Verbindung steht.

### Ausführung der Ammoniakbestimmung.

Für die Bestimmung sind etwa 2 g Blut erforderlich. Das Blut kann in einen Messkolben von 25 ccm abpipettiert und danach mit der Salzlösung bis auf die Marke versetzt werden. Der Kolben wird mitunter geschüttelt. Nach 2 Stunden filtriert man und misst 15—20 ccm des Filtrats für die Analyse ab. Einfacher ist es jedoch, das Blut in die bootförmigen Papierstückchen aufzusaugen. Für 2 g Blut sind 4 solcher Papierstückchen erforderlich. Diese werden in zwei Proberöhrchen übergeführt und je 10—12 ccm Salzlösung zugefügt. Nach 2 Stunden dekantiert man die Lösung, filtriert, wenn nötig, und wäscht mit ein paar ccm Wasser nach.

Die Flüssigkeit, die nicht weniger als 30 ccm betragen soll, wird in den Destillationskolben übergeführt. In die erste Vorlage gibt man 2 ccm n/200-Schwefelsäure, in die zweite Vorlage 10 ccm destilliertes Wasser.

Nachdem der Apparat zusammengesetzt ist und die Gummischläuche mittels der Quetschhähne abgeklemmt sind, setzt man die Saugpumpe in Gang. Sobald ein Vakuum von 20—30 mm erreicht ist — d. h. nach ein paar Minuten — öffnet man den Quetschhahn an dem Schlauch, der zu der Waschflasche mit Schwefelsäure führt, vorsichtig so weit, dass alle 2—3 Sekunden eine Luftblase durchgeht. Die Flüssigkeit beginnt nun zu sieden. Ist der Apparat in Ordnung, dann sollen doppelt so viele Blasen durch die zweite Vorlage als durch die Waschflasche gehen. Gehen mehr Blasen hindurch, dann ist entweder der Apparat undicht, oder es wird zu stark gesaugt. Man reguliert dann das Saugen durch einen an dem zur Saugpumpe führenden Gummischlauch angebrachten Quetschhahn.

Durch den Trichter lässt man nun vorsichtig 3 ccm gesättigtes Barytwasser in den Kolben eintreten, worauf die Destillation des Ammoniaks sofort beginnt und innerhalb 12 Minuten, nachdem 8—10 ccm Wasser übergegangen sind, beendet ist. Nur wenn die angewandte Menge Blut mehr Ammoniak enthält, als 5—6 ccm n/300-Lösung entspricht, ist es notwendig, längere Zeit zu destillieren. Nach vollendeter Destillation unterbricht man das Saugen durch Schliessen des Quetschhahnes und öffnet vorsichtig,



damit von der ersten Vorlage nach der zweiten nichts überspritzt, die Verbindung zur Waschflasche. Die Vorlage wird nun herausgenommen und das zu ihr führende Glasrohr mit kohlensäurefreiem Wasser ausgespritzt. Das Gesamtvolumen soll 20 ccm betragen. Dann wird das Ammoniak in üblicher Weise jodometrisch bestimmt.

Vor der Analyse muss der Apparat gereinigt werden, indem man nach Zusatz von Wasser und Barytlösung etwa 10 Minuten destilliert. Nachher stellt man zwei blinde Versuche an. Die Differenz in dem Verbrauch an  $n/300$ -Thiosulfatlösung darf nicht mehr als 0,03 ccm betragen.

## Die Bestimmung des Blutzuckers.

Seit der Zeit, als das Verfahren zum ersten Male veröffentlicht wurde (1912), sind einerseits an demselben verschiedene kleine Verbesserungen angebracht worden, andererseits ist in letzter Zeit das ganze Verfahren in einer wichtigen Beziehung umgearbeitet worden, so dass es viel einfacher geworden ist und auch genauere Resultate liefert, als die erste Arbeitsweise. Da indessen vielleicht jemand das ursprüngliche, später verbesserte Verfahren vorziehen könnte, wird es notwendig sein, beide Methoden für sich zu besprechen.

### A. Das alte Verfahren.

Nach demselben wird das mit Blut getränkte Papier mit der Uransalzlösung, deren Herstellung bei der Ammoniakbestimmung (siehe S. 28) ausführlich besprochen ist, extrahiert. Nach Zusatz von alkalischer Kupferlösung wird die Flüssigkeit zur Reduktion 2 Minuten gekocht und das gebildete Kupferoxydul, welches durch das Kaliumchlorid in Lösung gehalten wird, jodometrisch bestimmt. Hierbei müssen verschiedene Fehlerquellen ausgeschaltet werden. Ursprünglich wurde nur eine heisse, saure Kaliumchloridlösung zugesetzt. Infolgedessen gingen aber Spuren Eiweiss in Lösung über und verbrauchten dann etwas Jod. Durch Verwendung von Uran wurde dieser Übelstand beseitigt. Ferner oxydiert sich das Kupferoxydul rasch an der Luft. Dies vermeidet man durch Überleiten von Kohlensäure. Während des Erhaltens vor Ausführung der Titration muss die Luft durch einen auf dem Kochkolben angebrachten Gummischlauch mit Klemme ferngehalten werden. Weiter ist die Dauer des Siedens sehr von Einfluss auf das Resultat. Dieselbe muss genau 2 Minuten betragen. Schon ein Unterschied von 5 bis 10 Sekunden mehr oder weniger kann einen Fehler von mehreren Prozenten verursachen. Dieser Fehlerquelle kann man durch Benutzung einer Kontrolluhr aus dem Wege gehen. Sogar eine Differenz in der Kochdauer von 1 Sekunde bewirkt nach Ege<sup>1)</sup> einen merkbaren Fehler, derselbe ist jedoch für die meisten Bestimmungen nicht von Bedeutung. Auch ist der Beginn

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift 87, 77 (1918).



des Siedens nicht immer scharf zu erkennen. Dieser Umstand übt aber gleichfalls kaum einen Einfluss auf die Resultate aus. Von Wichtigkeit ist aber die Intensität des Kochens. Die Flamme muss so reguliert werden, dass der Inhalt des Kolbens nach 90 Sekunden zu kochen anfängt. Schon eine Differenz von 5 Sekunden bedeutet hier recht viel. Nun ist aber der Gasdruck meistens sehr schwankend, und es ist infolgedessen schwer, die Flamme konstant zu halten. Durch Anbringung eines Thermostaten kann man auch diese Fehlerquelle zum grössten Teil vermeiden. Allerdings können so grosse Schwankungen im Gasdruck vorkommen, dass der Thermostat versagt. Schliesslich hat E g e darauf aufmerksam gemacht, dass der Gummischlauch immer wieder jodbindende Substanzen abgibt. Diese Fehlerquelle trifft vielleicht für die jetzigen minderwertigen Gummisorten zu. Bei Verwendung der besten Gummisorten aus Friedenszeit machte sich diese Fehlerquelle jedenfalls nicht geltend. Nach den oben angedeuteten Verbesserungen gestaltet sich das Verfahren wie folgt:

Kaliumchlorid — gewöhnliche Handelsware — wird einmal aus Wasser umkristallisiert und von demselben ein grösseres Quantum gesättigter Lösung hergestellt.

Dann werden 3 g reines Uranylacetat in etwa 200 ccm Wasser gelöst (die Uransalze können bisweilen jodbindende Stoffe in störender Menge enthalten!), 1300 ccm der gesättigten Kaliumchloridlösung und 1,5 ccm 25%-ige Salzsäure zugefügt, und die Mischung mit Wasser auf 2 Liter ergänzt.

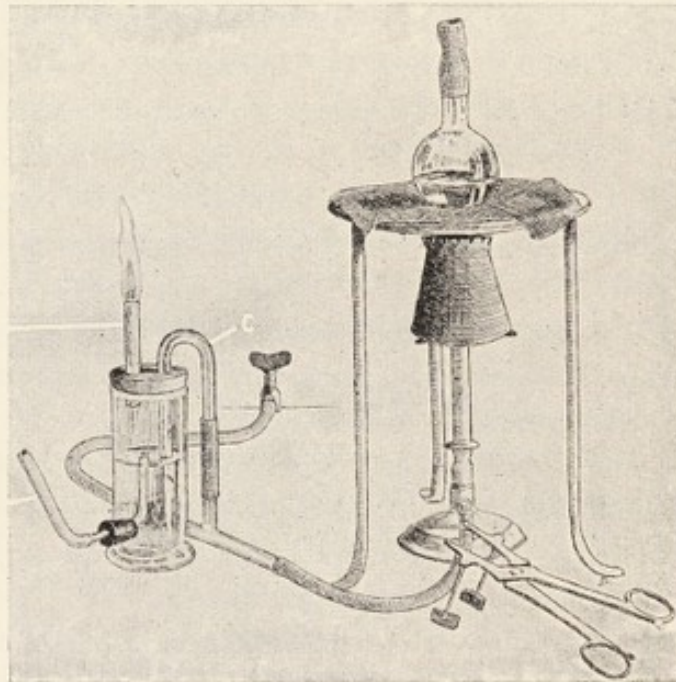
Die Kupferstammlösung besteht aus 160 g Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ) 100 g Kaliumcarbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), 66 g Kaliumchlorid und 4,4 g Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$ ), in Wasser zu 1 Liter gelöst.

Am besten löst man zuerst das schwerer lösliche Kaliumhydrogencarbonat in 600—700 ccm Wasser, setzt dann die übrigen Salze hinzu, lässt unter Kühlen erkalten und füllt bis zur Marke auf. Diese Stammlösung ist, ohne ihren Titer zu verändern, unbegrenzt haltbar. Für die Zuckerbestimmung werden nach Belieben 1—3 ccm derselben verwendet.

Nach Vermischung der zuckerhaltigen Salzlösung — 13 ccm — mit der Kupferlösung in einem 50 ccm-Jenenser Stehkolben, dessen umgebogener Rand abgesprengt ist, zieht man einen nicht zu dünnwandigen Gummischlauch von etwa 5 cm Länge bis etwa zur Hälfte über den Kolbenhals. Da der Gummischlauch fortwährend jodbindende Stoffe abgeben kann, empfiehlt E g e, den Schlauch in n/200-Jodlösung aufzubewahren. Der Kolben wird nun auf ein Drahtnetz gestellt und bis zum Sieden erhitzt. Die Zeit bis zum Beginn des Siedens soll 90 Sekunden betragen. Der Brenner muss zu diesem Zwecke mittels einer Schraube reguliert werden. Um den Gasdruck konstant zu halten, wird das Gas von der Leitung aus erst durch ein T-Rohr geleitet. Ein Teil des Gases geht zum Brenner, ein anderer Teil zu einer Flasche, die als Überlaufventil fungiert (Figur 5). Durch das Rohr c wird das Gas in



Wasser geleitet und hat eine bestimmte Menge desselben zu verdrängen. Das entweichende Gas wird durch das Rohr a abgeleitet und verbrannt. Das Rohr c ist ausserdem mit einem kleinen Loch b versehen für die Dauerflamme. Die Glasrohre c und a sollen einen inneren Durchmesser von etwa 8 mm besitzen. Um das Wasserniveau auf 3—4 mm Höhe konstant zu halten, trägt die Flasche ausserdem das Glasrohr d mit einem inneren Durchmesser von etwa 2 mm. Das Glasrohr ist mit einem Gummischlauch versehen, durch welchen man Wasser einführen kann. Senkt man den Gummischlauch, so läuft das überschüssige Wasser wieder ab. Durch diese Vorrichtung entweicht je nach dem Gasdrucke mehr oder weniger Gas durch das Ventil, während



Figur 5.

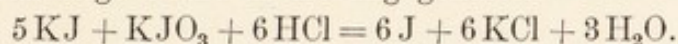
die zum Brenner gehende Gasmenge konstant bleibt, insofern nicht der Gasdruck unter ein gewisses Minimum herabsinkt. Einmal reguliert, funktioniert das Ventil automatisch, wenn die Wasserhöhe konstant bleibt. Nur wenn das Drahtnetz verbrannt wird oder die Löcher durch Russ verstopft sind, oder wenn der Brenner verunreinigt wird, ändert sich die Höhe der Flamme. Man muss deswegen bisweilen durch einen blinden Versuch den wirklichen Gasdruck kontrollieren. Das Drahtnetz muss vor diesem Versuche durch die Flamme angewärmt sein, wozu 15 Sekunden genügen. Die Dauer des Siedens wird mittels einer Kontrolluhr markiert. Diese Zeit wird von dem Augenblicke an gerechnet, in dem der Inhalt, gewöhnlich mit einem Schlage, in lebhaftes Kochen gerät. Genau nach Verlauf von 2 Minuten wird der Kolben von dem Brenner entfernt. Wenn nur noch einige Sekunden an den 2 Minuten fehlen, greift man mit einer eigens konstruierten Klemme sowohl über



das freie Schlauchende, wie über den Kolbenhals, klemmt nach vollen 2 Minuten den Schlauch zu und kühlt sogleich unter dem fließenden Wasserhahn ab. Wegen der Luftverdünnung kocht die Flüssigkeit hierbei noch einige Sekunden, bei ruhigem Halten des Kolbens ohne Schütteln bis zu 15 Sekunden. Die Klemme ist etwa nach dem Prinzip einer Operationspinzette nach P é a n konstruiert, besitzt aber noch zwei Schenkel, die zugleich den Kolbenhals fassen (vgl. Fig. 5). Während des Kühlens darf kein Wasser in das obere freie Ende des Schlauches hineingelangen. Dies Wasser würde später in den Kolben eingesaugt werden und zu unrichtigen Resultaten bei der Titration führen (Ege). Einige Forscher ziehen es vor, während des Kühlens Kohlensäure in den Kolben zu leiten. Dies ist jedoch unnötig.

Nach dem Erkalten aber soll die Luft auch während des Titrierens dauernd, und zwar durch Zufuhr von Kohlensäure ferngehalten werden. Dies geschieht am besten dadurch, dass die Kohlensäure aus einer Stahlflasche mittels eines Ventils und eines damit verbundenen Gummischlauches in den Kolben eingeleitet wird. Der Gummischlauch ist zu diesem Zwecke mit einem etwa 3 mm dicken, hakenförmig umgebogenen Metallröhrchen verbunden. Das Röhrchen wird am Kolbenrand aufgehängt und sitzt daran ziemlich fest, so dass es beim Titrieren nicht stört. Verschiedene andere Anordnungen, die vorgeschlagen worden sind, haben sich als unpraktisch erwiesen.

Als Indikator werden 1—2 Tropfen Stärkelösung (dieselbe wie bei der Reststickstoffbestimmung) verwendet. Die Jodlösung ist  $\frac{1}{100}$  oder  $\frac{1}{200}$  normal. Man bereitet sie aus Kaliumjodid und Kaliumjodat unter Zusatz von Säure. Eine der Säuremenge äquivalente Jodmenge wird in Freiheit gesetzt und durch das überschüssige Jodid in Lösung gehalten.



2 g Kaliumjodid und 1 ccm einer 2%-igen Kaliumjodatlösung werden in einem 100-ccm-Messkolben eingeführt und mit 10 ccm n/10-Salzsäure versetzt. Schliesslich wird kohlensäurefreies Wasser bis zur Marke zugefügt. Nach Umschütteln und Stehen während 5 Minuten kann die Lösung in die Mikrobürette übergeführt werden. Zur Darstellung einer n/200-Lösung verwendet man 1 g Jodkalium, 1 ccm Jodatlösung und 5 ccm n/10-Salzsäure. Die Jodlösung ist im Winter wenigstens zwei Tage haltbar. Im Sommer muss sie täglich frisch bereitet werden. Bei der Titration soll der Kolben auf einer weissen Unterlage stehen. Es ist darauf zu achten, dass während der Titration eine reichliche Menge Kohlensäure eingeleitet werden muss. Ferner darf man den Kolben bei der Titration nicht mehr als nötig schütteln. Leise, drehende Bewegungen genügen. Bei unvorsichtigem Arbeiten und ungenügender Kohlensäurezufuhr erzielt man zu geringe Werte. Diese Versuchsfehler sind nach meiner Erfahrung von grösserer Bedeutung, als die meisten übrigen.



### Die Ausführung der Blutzuckerbestimmung.

100—130 mg Blut lässt man durch das vorher gewogene Papier aufsaugen und wägt wieder. Unmittelbar darauf wird das Papier in die Salzlösung — 6,5 ccm <sup>1)</sup> — übergeführt, in welcher es mindestens 30 Minuten verweilen soll. Doch kann es auch 24 Stunden in derselben verbleiben. Die vollständig klare Lösung wird in den Kochkolben übergeführt. Lässt man das bluthaltige Papier an der Luft mehr oder weniger eintrocknen, so haftet das Eiweiss in der Salzlösung entsprechend schlechter an dem Papier. Das Proberöhrchen und das Papier werden mit 6,5 ccm Salzlösung nachgespült und diese zu der ersten Extraktionsflüssigkeit zugegossen. Schliesslich wird mit 1—3 ccm Kupferlösung versetzt, der Gummischlauch über den Kolbenhals gezogen und der Kolben auf das Drahtnetz gestellt. Der Anfang des Kochens wird mittels der Kontrolluhr festgestellt. Nach 110—115 Sekunden langem Sieden fasst man mit der Klemme um Kolbenhals und Schlauch, kneift letzteren nach vollen 2 Minuten rasch zu und kühlt den Kolben schnell unter dem Wasserhahn ab. Die Flüssigkeit erkaltet auf diese Weise innerhalb 30 Sekunden vollständig. Der Kolben wird unter der Bürette auf eine weisse Unterlage gestellt und die Klemme langsam geöffnet, damit die Luft nicht auf einmal zu stürmisch auftritt. (Man kann schon während des Öffnens des Kolbens mit der Kohlensäurezuleitung beginnen. Nur soll man dies systematisch ausführen oder unterlassen.) Sofort wird dann auch das Zuleitungsröhrchen für die Kohlensäure am Rande aufgehängt und das Ventil an der Kohlensäureflasche geöffnet. Es ist unbedingt notwendig, hierbei ein Druckreduzierventil zu benutzen. Man setzt nun 1—2 Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert, während man unter kreisender Bewegung schwach schüttelt, bis zu bleibender Blaufärbung, die 10—15 Sekunden bestehen bleiben muss. Aus dem Verbrauch an Jodlösung kann man entweder mittels einer empirischen Formel  $(a - 12) : 4$  die gesuchte Zuckermenge in Dezimilligrammen berechnen <sup>2)</sup>, wobei  $a$  die verbrauchte Menge n/200-Jodlösung in Zehntelkubikzentimetern bedeutet. (Für n/100-Jodlösung ist die Formel  $(a - 6) : 2$ ). Bequemer ist es jedoch, die folgende Tabelle (Seite 35) zu benutzen, in welcher die der verbrauchten Jodlösung entsprechenden Zuckerwerte bis zu 0,8 mg (bzw. 2,5 mg) direkt angegeben sind.

Bei der Mikrobestimmung entsprechen die Werte allen im Blute vorhandenen reduzierenden Stoffen, die nicht immer mit Traubenzucker identisch sind. Doch teilt die Mikromethode diese Schwäche mit sämtlichen Reduktionsmethoden. Da die reduzierenden Stoffe zwischen Plasma und Formelementen nicht gleichmässig verteilt sind, muss man sich hier wie auch sonst vor einer unrichtigen Mischung derselben bei der Blutentnahme hüten.

<sup>1)</sup> Man kann auch mehr von der Salzlösung zusetzen, nur muss man in diesem Falle mit entsprechend weniger Lösung nachwaschen. Das Gesamtvolumen soll immer 13 ccm betragen.

<sup>2)</sup> Die Ziffer 12 entspricht dem Jodverbrauch der Lösung an sich.



# Reduktionstabelle

| n/200-Jodlösung<br>ccm | Zucker<br>mg | n/100-Jodlösung<br>ccm | n/200-Jodlösung<br>ccm | Zucker<br>mg | n/100-Jodlösung<br>ccm |
|------------------------|--------------|------------------------|------------------------|--------------|------------------------|
| 0,18                   | 0,02         | —                      | 1,24                   | 0,28         | 0,64                   |
| 0,23                   | 0,03         | —                      | 1,28                   | 0,29         | 0,66                   |
| 0,28                   | 0,04         | 0,12                   | 1,32                   | 0,30         | 0,69                   |
| 0,32                   | 0,05         | 0,16                   | 1,36                   | 0,31         | 0,71                   |
| 0,36                   | 0,06         | 0,18                   | 1,40                   | 0,32         | 0,73                   |
| 0,40                   | 0,07         | 0,20                   | 1,42                   | 0,33         | 0,75                   |
| 0,44                   | 0,08         | 0,22                   | 1,48                   | 0,34         | 0,77                   |
| 0,48                   | 0,09         | 0,24                   | 1,52                   | 0,35         | 0,80                   |
| 0,52                   | 0,10         | 0,26                   | 1,56                   | 0,36         | 0,82                   |
| 0,56                   | 0,11         | 0,28                   | 1,60                   | 0,37         | 0,84                   |
| 0,60                   | 0,12         | 0,30                   | 1,64                   | 0,38         | 0,86                   |
| 0,64                   | 0,13         | 0,32                   | 1,68                   | 0,39         | 0,88                   |
| 0,68                   | 0,14         | 0,34                   | 1,72                   | 0,40         | 0,91                   |
| 0,72                   | 0,15         | 0,36                   | 1,76                   | 0,41         | 0,93                   |
| 0,76                   | 0,16         | 0,38                   | 1,80                   | 0,42         | 0,95                   |
| 0,80                   | 0,17         | 0,40                   | 1,84                   | 0,43         | 0,97                   |
| 0,84                   | 0,18         | 0,42                   | 1,88                   | 0,44         | 0,99                   |
| 0,88                   | 0,19         | 0,44                   | 1,92                   | 0,45         | 1,02                   |
| 0,92                   | 0,20         | 0,47                   | 1,96                   | 0,46         | 1,04                   |
| 0,96                   | 0,21         | 0,49                   | 2,00                   | 0,47         | 1,06                   |
| 1,00                   | 0,22         | 0,51                   | 2,04                   | 0,48         | 1,08                   |
| 1,04                   | 0,23         | 0,53                   | 2,08                   | 0,49         | 1,10                   |
| 1,08                   | 0,24         | 0,55                   | 2,12                   | 0,50         | 1,12                   |
| 1,12                   | 0,25         | 0,58                   | 2,52                   | 0,60         | —                      |
| 1,16                   | 0,26         | 0,60                   | 2,92                   | 0,70         | —                      |
| 1,20                   | 0,27         | 0,62                   | 3,32                   | 0,80         | —                      |
|                        |              |                        | —                      | 1,00         | 2,25                   |

## B. Das neue Verfahren.

Um möglichst exakte Werte mit der Mikromethode zu erhalten, muss man die Vorschriften peinlich genau befolgen. Nur dann lassen sich die Fehlerquellen vermeiden. Die wichtigsten von diesen sind 1. die Intensität des Kochens, 2. die Kochdauer und 3. die Luftoxydation. Hierzu kommt die Verunreinigung durch den Gummischlauch, der noch dazu bisweilen undicht sein kann. Sämtliche Schwierigkeiten sind nun bei dem neuen Verfahren so vollständig beseitigt worden, dass sie nicht mehr berücksichtigt zu werden brauchen. Auch verläuft die Titration insofern schärfer, als der Farbumschlag von blau in farblos erfolgt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass das gebildete Kupferoxydul durch Jodsäure oxydiert und der Überschuss an Jodsäure nach Zusatz von Jodkalium durch Titration mit Thiosulfatlösung ermittelt wird. Die kupferoxydulhaltige Lösung muss vorher angesäuert werden, da die Jodsäure nur in saurer Lösung Kupferoxydul oxydiert. Die übrigen in der Lösung vor-



handenen Blutbestandteile werden unter den gegebenen Bedingungen von der Jodsäure nicht angegriffen. Man verwendet dieselbe Uransalzlösung, und die Extraktion des Blutes wird in gleicher Weise ausgeführt. Dagegen werden statt der alkalischen Kupferstammlösung folgende Lösungen benutzt:

1. Die Alkalilösung enthält 75 g Kaliumkarbonat und 20 g Seignettesalz in 1 l Wasser. 2 ccm derselben werden für jede Analyse verwendet. Sie können aus einer Bürette abgemessen werden. Die Reduktionsflüssigkeit ist aus dem Grunde etwas stärker alkalisch als früher gewählt, weil dadurch etwas mehr Kupferoxyd durch den Zucker reduziert wird.

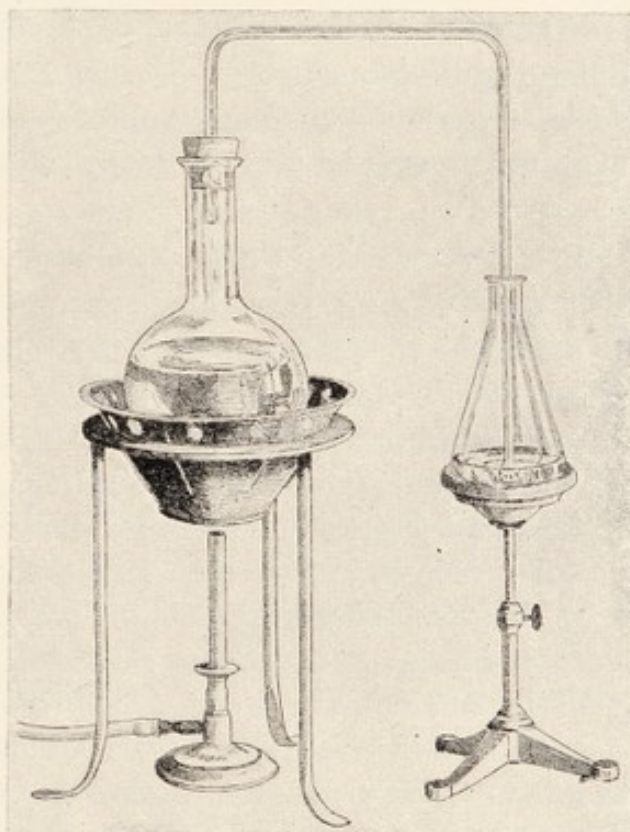
2. Die Jodatlösung, welche zudem das Kupfersulfat enthält, besteht aus 10 ccm n/10-Jodatlösung, 0,25 g Kupfersulfat (oder 2,5 ccm einer 10%-igen Kupfersulfatlösung), welche mit Wasser auf 100 ccm ergänzt werden. Diese Lösung ist haltbar, wenn eine s a u r e Jodatlösung benutzt wird. Das Jodat muss ganz rein sein und kann selbst in folgender Weise bereitet werden: 20 g Jodkalium werden in möglichst wenig Wasser gelöst, mit einer heissen Lösung von 40 g Permanganat in 1 l Wasser eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erhitzt und dann durch Zusatz von Alkohol — tropfenweise — entfärbt. Man filtriert den entstandenen Braunstein ab, säuert mit Essigsäure an und dampft das Filtrat bis auf etwa 50 ccm ein. Die ausgeschiedenen Kristalle werden einmal umkristallisiert, auf einem Uhrglase gesammelt (sie dürfen nicht mit Papier in Berührung kommen), bei 200° getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt. Zur Darstellung der n/10-Jodatlösung werden 3,5667 g Jodat mit 20 ccm 20%-iger Schwefelsäure und Wasser auf 1 l ergänzt.

### Die Ausführung der Zuckerbestimmung.

Die mit dem Blut getränkten Papierstückchen werden wie vorher mittels 6,5 + 6,5 ccm (bzw. 10 + 3 ccm) Salzlösung extrahiert und die Lösung in einen 100—125 ccm fassenden Erlenmeyerkolben übergeführt. Hierzu gibt man 2 ccm der Jodatlösung und 2 ccm Alkalilösung. Dann wird wie bei der Mikrokjeldahlmethode indirekt erhitzt. Der Wasserdampf wird in einem 500-ccm-Kochkolben entwickelt (ein Zusatz von Siedesteinen ist erforderlich) und durch ein Glasrohr bis unmittelbar auf den Boden des Erlenmeyerkolbens geleitet (siehe Fig. 6). Das Glasrohr ist am unteren Ende kugelförmig aufgeblasen und die Kugel mit 5—6 kleinen Löchern versehen, damit der Wasserdampf sich gleichmässig in der Flüssigkeit verteilt und nichts überspritzt. Der Erlenmeyerkolben befindet sich auf einem beweglichen Stativ. Unmittelbar nachdem die Zuleitung von Wasserdampf aus dem vorher erhitzten Kochkolben begonnen hat, wird die Zeit mittels einer 4 Minuten anzeigenden Sanduhr festgestellt. Nachdem die Sanduhr abgelaufen ist, setzt man aus einer Pipette 2 ccm 20%-ige Schwefelsäure (Vol.-%) hinzu, senkt das Stativ



und spült das Glasrohr mit der Spritzflasche ab. Man nimmt nun den Kolben weg und lässt ihn mindestens 5 Minuten — oder auch länger — ruhig stehen, setzt dann etwa 25 ccm Wasser hinzu und kühlt, wenn nötig. Nach Zusatz von 0,5 ccm einer 5%-igen Jodkaliumlösung und 1—2 Tropfen Stärkelösung titriert man mit n/100- oder n/200-Thiosulfatlösung etwa bis farblos. Bei einem blinden Versuch sollen 0,03 ccm n/100-Thiosulfatlösung verbraucht werden. 0,28 ccm n/100-Thiosulfatlösung entsprechen regelmässig 0,1 mg Zucker. Die Reduktionsformel ist folglich einfach  $(1,97 - a) : 0,28 =$  der ge-



Figur 6.

suchten Zuckermenge in Zehntel-Milligrammen. Man kann auch die Jodsäure zuletzt mit der Schwefelsäure zusammen zusetzen. Nur muss man in diesem Falle die Mischung genau abmessen, und zwar verwendet man 10 ccm der n/10-Jodatlösung, welche man vorher mit 20%-iger Schwefelsäure auf 100 ccm ergänzt hat. Wird das Kupfersulfat zugleich mit der Uran-Salzlösung zugesetzt ( $800 \text{ mg CuSO}_4 + 5 \text{ H}_2\text{O}$  zu 2 l Salzlösung), so kommt man mit einer Abmessung weniger aus.

Die Vorteile dieser Methode sind einleuchtend: Das Kupferoxydul wird von der Jodsäure so schnell oxydiert, dass die Luft nicht einwirken kann. Die Reduktion ist ferner nach 4 Minuten langem Kochen beendet, doch schadet auch längeres Kochen nichts. Tatsächlich ist sie schon früher fertig und so macht es auch nichts aus, ob man 3 oder 4 Minuten erhitzt. Aus



demselben Grunde übt das Schwanken des Gasdruckes, sobald ein kräftiger Bunsenbrenner verwendet wird, keinen Einfluss auf die Resultate aus. Schliesslich ist der Umschlag bei der Titration sehr scharf. Ein Nachblauen tritt erst nach mehreren Minuten ein.

## Die Bestimmung der Lipoidstoffe.

Bekanntlich kommen im Blute mehrere Lipoide vor, die eine verschiedene Bedeutung besitzen. Sie können folgendermassen eingeteilt werden: 1. Das Neutralfett und die Fettsäuren, 2. das Cholesterin, 3. die Cholesterinester und 4. die Phosphatide. Die Bestimmung der einzelnen Lipoide setzt voraus: 1. eine exakte Methode zur Fettbestimmung, 2. die Trennung der verschiedenen Lipoidstoffe von den übrigen Blutbestandteilen und voneinander.

### A. Die Methode der Fettbestimmung.

Ebenso wie sich der Traubenzucker durch die Reduktionsmethoden bestimmen lässt, können auch die Lipoide nach einem ähnlichen Verfahren bestimmt werden. Das Prinzip desselben besteht darin, dass Chromsäure von den Fettarten reduziert wird, und zwar ist die reduzierte Menge der vorhandenen Lipoidmenge genau proportional. Der Überschuss an Chromsäure setzt eine äquivalente Jodmenge in Freiheit. Da die Fettarten aber viel stärker als der Zucker reduzieren, verwendet man auch für die Mikroanalyse besser  $n/10$ - als  $n/100$ -Lösungen. 0,1 mg Triolein reduziert nämlich 0,245 ccm  $n/10$ -Chromsäurelösung, entsprechend 0,245 ccm  $n/10$ -Jodlösung, während 0,1 mg Traubenzucker 0,24—0,28 ccm  $n/100$ -Jodlösung verbraucht. Es hat sich herausgestellt, dass Cholesterin und Cholesterinester genau dieselbe Chromsäuremenge wie Fett verbrauchen, während 0,1 mg Phosphatide viel weniger, nämlich 0,17 ccm  $n/10$ -Chromsäure reduzieren. 0,1 mg Fettsäuren reduzieren 0,25 ccm Chromsäure. Für die Bestimmung werden die Lipoide immer in Lösung angewandt. Vor dem Zusatz der Chromsäure muss aber das Lösungsmittel stets vollständig entfernt werden, da es gleichfalls Chromsäure verbraucht. Dies ist jedoch leicht zu erreichen, da sämtliche üblichen Lösungsmittel flüchtig sind. Weiter hat es sich gezeigt, dass nur drei Lösungsmittel praktisch brauchbar sind, nämlich Benzol, Petroleumäther (Sdpkt.  $50^{\circ}$ — $70^{\circ}$ ) und Alkohol. Alle diese müssen vor dem Gebrauch durch nochmalige Destillation gereinigt werden. Einmal gereinigt, sind sie haltbar.

Nach Abmessung einer gegebenen Menge Fettlösung — die im allgemeinen nicht mehr als 1 mg Substanz enthalten soll — in ein Proberöhrchen wird 1 ccm 1%-ige Natronlauge zugesetzt und die Mischung in einem Sandbade so lange erhitzt, bis jeder Geruch nach dem Lösungsmittel verschwunden ist. Infolge der Anwesenheit des Alkalis verteilt sich das Fett



zu einer Emulsion, in welcher Form es von der Chromsäure rasch oxydiert wird. Ohne Alkalizusatz ballt sich das Fett usw. zusammen und wird nur langsam und unvollständig von der Chromsäure angegriffen. Nachher setzt man genau 1 ccm n/10-Chromsäurelösung hinzu und kühlt ab, bzw. lässt stehen, bis die Mischung erkaltet ist. Die Chromsäurelösung enthält 4,9083 g Kaliumbichromat und 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure im Liter. Sie darf nicht mit Gummischläuchen oder überhaupt mit organischen Substanzen in Berührung kommen.

Schliesslich fügt man aus einer Bürette mit Glashahn 5 ccm konzentrierte reine Schwefelsäure hinzu, schüttelt um und lässt die Mischung ruhig mindestens 15 Minuten am Stativ stehen. Die Reduktion ist nun beendet. Man kann das Proberöhrchen auch 24 Stunden stehen lassen. Während der Reduktion schlägt die rein gelbe Farbe der Chromsäure infolge der Bildung von grünem Chromoxyd in gelbgrün um. Eine rein grüne Farbe zeigt, dass die Chromsäure verbraucht worden ist. Die Analyse ist deshalb jedoch noch nicht ungültig. Man muss in diesem Falle nur nach Bedarf noch 0,5 bis 2,0 ccm mehr Chromsäure hinzusetzen, bis sich eine bleibende gelbgrüne Farbe zeigt. Setzt man mehr als 2 ccm Chromsäure im ganzen hinzu, dann muss man auch mehr Schwefelsäure — 2,5 ccm — zufügen.

Schliesslich füllt man das Proberöhrchen mit Wasser, giesst den Inhalt in ein Becherglas und spült zweimal mit Wasser nach bis zu einem Gesamtvolum von etwa 100—150 ccm. Nach Zusatz von 1 ccm 5%-iger Jodkaliumlösung und ein Paar Tropfen Stärkelösung titriert man mit n/10-Thiosulfatlösung bis zum Umschlag in schwachgrün (von Chromoxyd bedingt). Durch blinde Versuche wird der Chromsäureverbrauch der Reagenzien festgestellt. Die Berechnung ist einfach. Die Chromsäuremenge *a* weniger der verbrauchten Thiosulfatlösung *b*, dividiert durch den Faktor 2,45 entspricht der Fettmenge in mg. Von der zugesetzten Chromsäuremenge muss ausserdem die durch die blinden Versuche festgestellte Menge Chromsäure, welche von den angewandten Reagenzien verbraucht wird, abgezogen werden.

## **B. Die Trennung der Lipide des Blutes.**

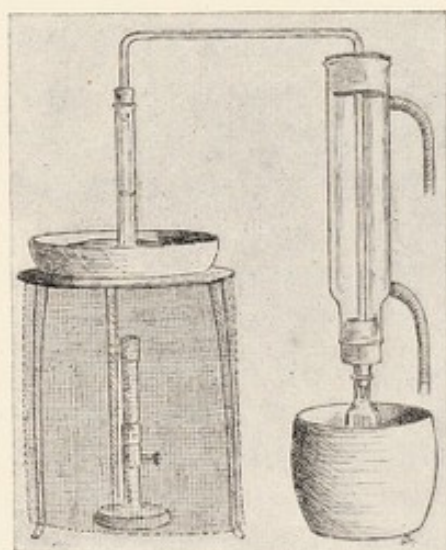
Eine exakte Trennung des Cholesterins und der Cholesterinester von den übrigen Lipoiden ist mit Hilfe der Digitoninmethode von W i n d a u s recht einfach. Jedoch ist es zur Zeit unmöglich, die Phosphatide von den Fettarten exakt zu trennen, wenn sie zusammen in Lösung vorkommen. Dagegen gelingt diese Trennung, soweit es sich um die Blutuntersuchung handelt, sehr bequem durch eine fraktionierte Extraktion. Es hat sich gezeigt, dass man durch Extraktion von auf Papier eingetrocknetem Blut mit Petroleumäther allein das Cholesterin und das Neutralfett extrahieren kann, während die Phosphatide, die Cholesterinester und die Seifen zurück-



blieben. Durch eine folgende Extraktion mit Alkohol werden die letzteren sämtlich quantitativ gelöst. Man hat also 1. die primäre Petrolätherextraktion und 2. die sekundäre Alkoholextraktion. Durch weitere Behandlung der Extrakte kann man das Neutralfett von dem Cholesterin und die Phosphatide von den Cholesterinestern trennen. Dagegen werden die Seifen (und Fettsäuren) mit den Phosphatiden zusammen bestimmt.

## Die Bestimmung des Neutralfettes.

Von dem zu untersuchenden Blut werden höchstens 130 mg in ein entfettetes Papierstückchen eingesaugt. Nachdem das Blut an der Luft vollständig eingetrocknet ist (Trocknen bei höherer Temperatur führt zu unrichtigen Resultaten), wird das Papier in einem reinen Proberöhrchen mit



Figur 7.

8—10 ccm Petroläther versetzt. Nach mindestens 10 Minuten — man kann aber auch 24 Stunden warten — ist alles Neutralfett und alles Cholesterin herausdiffundiert. Man nimmt mittels eines mit einem Platindrahte versehenen Glasstabes das Papier heraus und führt es in ein anderes Proberöhrchen über, wo es mit 8—10 ccm 92<sup>0</sup>/<sub>100</sub>-igem Alkohol versetzt wird.

Der Petroläther wird auf dem Sandbade soweit wie möglich abdestilliert. Der ganze Destillationsapparat (siehe Fig. 7) besteht aus einem Liebig'schen Kühler, dessen inneres Rohr oben umgebogen und durch einen Korkstopfen mit dem Proberöhrchen verbunden ist. Das untere Ende ist mit einem Korkstopfen, der wegen der Luftzufuhr seitlich mit einer Rinne versehen ist, in dem Hals der Petrolätherflasche befestigt. Die Flasche steht während der Destillation in einem Gefässe mit kaltem Wasser. Schliesslich umwickelt man den Dreifuss, auf dem das Sandbad steht, mit einem Drahtnetz, um eine Explosion des Petroläthers zu verhindern.

Nachdem der Petroläther grösstenteils abdestilliert worden ist, setzt man 0,1 ccm einer  $\frac{1}{2}\%$ -igen Digitoninlösung hinzu und erwärmt einige Augenblicke im Sandbad. Das Cholesterindigitonid scheidet sich sofort ab. Doch lässt man das Ganze einige Stunden oder noch besser bis zum nächsten Tage stehen, setzt darauf einige ccm Petroläther hinzu, rührt den Niederschlag mit einem Glasstabe gut um und filtriert durch ein entfettetes kleines Filter (von etwa 3 cm Durchmesser). Man spült mit einigen ccm Petroläther nach und destilliert den Petroläther auf dem Sandbade ab. Nach Zusatz von



1 cem Alkali erhitzt man noch, bis der Geruch nach Petroläther verschwunden ist, setzt dann Chromsäure hinzu und arbeitet weiter, wie oben beschrieben. Sowohl das Cholesterindigitonid wie das Digitonin selbst ist in Petroleumäther absolut unlöslich. Am besten wird, da meistens nur sehr geringe Mengen Fett zugegen sind, gleichzeitig ein blinder Versuch angestellt. Die Digitoninlösung wird aus kristallisiertem Digitonin (Merck) und nochmals destilliertem, absolutem Alkohol bereitet. In der Kälte kristallisiert das Digitonin gewöhnlich wieder aus, geht aber beim Erwärmen schnell wieder in Lösung.

### Die Bestimmung des Cholesterins.

Man bestimmt alles in Petroläther Lösliche in üblicher Weise. Die Differenz zwischen dem hierbei erhaltenen Werte und dem für Neutralfett gefundenen entspricht dem vorhandenen Cholesterin. Dasselbe besitzt das gleiche Reduktionsvermögen wie Neutralfett. Da der Cholesteringehalt gewöhnlich ziemlich unveränderlich bleibt, kann man sich oft mit den Werten für die ganze Petrolätherfraktion allein begnügen.

### Die Bestimmung der Cholesterinester.

Die sekundäre Alkoholextraktion geht viel langsamer vonstatten als die Petrolätherextraktion, sie ist erst nach Verlauf von 24 Stunden beendet. Die Papierstückchen werden dann aus der Lösung entfernt und der Alkohol nach Zusatz von einem Tropfen 25%-iger Natronlauge und einem kleinen (etwa  $2 \times 2$  mm grossen) Papierstückchen als „Siedestein“ im Wasserbade eingedunstet. Schliesslich kann man einige Augenblicke Luft durchsaugen, notwendig ist dies allerdings nicht. Die Phosphatide und auch die Ester sind nun quantitativ verseift und das Cholesterin der Ester in Freiheit gesetzt. Man fügt darauf etwa 8—10 cem Petroläther hinzu, verschliesst das Proberöhrchen mit einem Korkstopfen und lässt es 24 Stunden stehen, nach welcher Zeit das Cholesterin herausdiffundiert ist. Nach dem Filtrieren und einmaligen Auswaschen mit Petroläther wird das Filtrat auf dem Sandbade abdestilliert und das Cholesterin nach Zusatz von Alkali etc. wie üblich bestimmt. Da 100 Teile Cholesterinester etwa 56 Teilen Cholesterin entsprechen, muss man den gefundenen Wert mit 0,56 dividieren, um den Wert für die Ester zu finden.

### Die Bestimmung der Phosphatide.

Nach der Alkohol-Extraktion werden die Papierstückchen aus der Lösung herausgenommen, und nach Zusatz eines Tropfens 4%-iger Natronlauge sowie eines kleinen ( $2 \times 2$  mm grossen) Papierstückchens wird der Alkohol im Wasserbade verjagt. Schliesslich wird das Röhrchen mittels der



Saugpumpe getrocknet. Man setzt nun 1 Tropfen 5%-iger Schwefelsäure und 8—10 ccm Petroläther hinzu, rührt mit dem Glasstabe um und filtriert durch ein trockenes Filter. Der Rückstand wird einmal mit Petroläther nachgewaschen. Wasser darf nicht auf das Filter gebracht werden. Die Verseifung der Phosphatide ist notwendig, um ein farbloses Filtrat zu erzielen. Sonst gehen Farbstoffe in den Petroläther über, und man erhält infolgedessen falsche Resultate. Schliesslich wird der Petroläther aus dem Sandbade abdestilliert und weiter wie üblich verfahren. Von dem gefundenen Werte wird der Wert für die Cholesterinester abgezogen (selbstverständlich erst nach Umrechnung auf Prozente!). Die Differenz entspricht dem Gehalt des Blutes an Phosphatiden und Seifen, als Fettsäuren berechnet. Da eine Trennung dieser beiden Körper nicht gelungen ist, wird die Differenz am besten einfach als Phosphatide berechnet. Die Phosphatide machen nämlich den grössten Teil der Fraktion aus, während die Seifen-Fettsäuren gewöhnlich nur in sehr geringer Menge vorhanden sind. Da die Phosphatide in geringerem Masse als die Fettsäuren reduzieren, muss man entweder die Phosphatide als Fettsäuren berechnen oder den erhaltenen Wert durch Multiplikation mit  $\frac{3}{2}$  in Phosphatide umrechnen. Oft genügt die Bestimmung der ganzen Alkoholfraktion allein, da die Ester meistens ziemlich unverändert bleiben.

### Die Bestimmung des Wassers, bzw. der Trockenmasse.

Für diese Bestimmung muss man entweder über eine Torsionswaage verfügen, die das Gewicht mit einer Genauigkeit von 0,1 mg zu schätzen erlaubt, oder man benutzt — und das ist noch besser — eine gewöhnliche analytische Waage. Ferner bedarf man eines Trockenschrankes für Temperaturen bis zu 100°, in dem die Papierstückchen zunächst bis zu konstantem Gewicht getrocknet werden, worauf man sie im Exsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt. Für die Bestimmung wird das getrocknete Papier zuerst gewogen, mit Blut getränkt, wieder gewogen, hierauf eine Stunde bei 100° getrocknet, worauf man schliesslich im Exsikkator erkalten lässt. Schon nach einigen Minuten kann man dann die Schlusswägung ausführen.

Es ist klar, dass die Wägefehler bei der ersten und letzten Wägung von grösster Bedeutung für die Ergebnisse sind. Hat man z. B. 100 mg Blut mit 18 mg Trockenmasse abgewogen, so bedeutet ein Fehler von 0,5 mg bei der Wägung des Gesamtblutes nur eine absolute Differenz von 0,1% Trockenmasse, während derselbe Fehler bei der Wägung des Papiers allein oder des Papiers mit der Trockenmasse 0,5% ausmacht. Schon ein Wägefehler von 0,1 mg bedingt eine absolute Differenz von 0,1%, d. h. er lässt 17,9% bzw. 18,1% Trockenmasse statt des richtigen Wertes 18% finden. Damit also der Wägefehler nicht zu gross wird, muss man bei Verwendung der Torsionswaage folgende Punkte berücksichtigen:



1. Bei der Wägung wird keine Klammer benutzt, sondern das Papierstückchen soll ein rundes Loch besitzen, mit Hilfe dessen es an der Wage aufgehängt werden kann. Beim Trocknen wird es auf einen massiven Stahldraht, der im Exsikkator Platz finden kann, gehängt. Dieser Stahldraht ist auf einer kleinen Holzplatte montiert; statt seiner genügen auch Stecknadeln auf Korkplatten.

2. Man verwendet mehr Blut als 100 mg, am besten 150 mg, wofür man die Papierstückchen entsprechend grösser wählt. Andererseits bietet es keinen Vorteil, noch mehr Blut zu nehmen, da dann das Aufsaugen zu lange Zeit beansprucht und Wasserverluste durch Verdunstung entstehen können.

3. Aus diesem Grunde ist es auch nötig, dass das Blut schnell und reichlich aus der Wunde strömt, was überdies auch deshalb erforderlich ist, weil eine unrichtige Mischung von Plasma und Formelementen durch Auspressen hier von grösserer Bedeutung als bei den übrigen Mikromethoden ist.

4. Man führe stets Doppelbestimmungen aus.

Unter Berücksichtigung aller dieser Umstände kann man mittels der Torsionswage genaue Resultate erhalten. Einfacher gestaltet sich jedoch die Sache, wenn man die etwas mühsamere Wägung auf der analytischen Wage ausführen will. Das Papierstückchen wird in einem Wägegläschen mit Glasstopfen bei 100° eine Stunde getrocknet und gewogen. Nach Aufsaugen des Blutes führt man das Papier sofort in das Wägegläschen über, setzt unmittelbar darauf den Stopfen auf und wägt wieder. Da kein Wasser verdunsten kann, kann man mit der Wägung nach Belieben warten. Schliesslich trocknet man wieder eine Stunde bei 100° und führt die Schlusswägung aus. Die Gefahr einer Wasserverdunstung ist auf diese Weise viel geringer als bei Verwendung der Torsionswage. Benutzt man immer dieselben Wägegläschen, so ist das Anfangsgewicht ungefähr bekannt, da die Papierstückchen, welche selbstverständlich nicht durchlocht zu sein brauchen, ungefähr das gleiche Gewicht besitzen. Die letztere Methode wird im hiesigen Institute vorgezogen.

## Die Bestimmung der Salizylsäure.

(Von Dr. C. Friderichsen.)

200—600 mg Blut werden durch bootförmige Papierstückchen eingesaugt und deren Gewicht sofort mit Hilfe der Torsionswage festgestellt. Dann wird das Papierstückchen in einem Reagenzglas mit zirka 10 ccm einer kochend heissen Chlorkaliumlösung, die 1,5 ccm 25%-ige Salzsäure pro Liter enthält, versetzt, worauf man das Gemisch 3 Stunden stehen lässt. Die Chlorkaliumlösung wird nun in einen Scheidetrichter übergeführt, das Papier mit Chlorkaliumlösung und Wasser nachgewaschen, und die gesamte Flüssig-



keitsmenge viermal mit Äther ausgeschüttelt. Alle Salizylsäure ist nun in die ätherische Lösung übergegangen. Der Äther wird darauf in einem kleinen Erlenmeyerkolben im Wasserbade bei  $34^{\circ}$  verdunstet. Sobald aller Äther verjagt ist, entfernt man den Kolben sofort aus dem Wasserbade, da es sich gezeigt hat, dass die Salizylsäure sich verflüchtigt, wenn man den Kolben längere Zeit bei der angegebenen Temperatur stehen lässt.

Um die letzten Reste der Ätherdämpfe aus dem Kolben zu verjagen, leitet man einen Luftstrom hindurch, dann löst man die Salizylsäurekristalle in Wasser und verdünnt je nach der Menge des angewandten Blutes und der vorhandenen Salizylsäure auf 25—50 ccm. Das im folgenden beschriebene kolorimetrische Verfahren gibt die genauesten Resultate, wenn die Verdünnung zwischen 1 : 50 000—1 : 100 000 liegt. Doch kann man auch bei Verdünnungen von 1 : 20 000—1 : 200 000 genaue Ablesungen erzielen. Bei stärkerer oder schwächerer Konzentration ist die Bestimmung sehr unsicher.

Für die kolorimetrische Bestimmung werden eine Reihe von Proberöhrchen von genau derselben Breite und von gleich dickem Glase, dann eine 1%-ige Eisenalaunlösung und eine Standardlösung von Salizylsäure (B) benutzt. Eine 0,01%-ige Natriumsalizylatlösung, die 0,0862 mg Salizylsäure pro ccm enthält, eignet sich am besten.

Zuerst wird der ungefähre Salizylsäuregehalt der Lösung festgestellt. Darauf findet die genaue Bestimmung statt: 10 ccm der unbekannten Salizylsäurelösung (A) werden in eins der Proberöhrchen abpipettiert und tropfenweise mit der Eisenalaunlösung versetzt, bis die violette Farbe an Stärke nicht mehr zunimmt. Darauf gibt man in ein anderes Reagenzglas 10 ccm Wasser, wozu ebenso viele Tropfen Eisenalaunlösung gesetzt werden, wie ins erste Glas. Schliesslich setzt man aus einer Bürette so viele Tropfen der Standardlösung (B) hinzu, bis die Farbe der beiden Lösungen übereinstimmt. Aus den hinzugesetzten ccm Wasser und Salizylsäurelösung wird der ungefähre Salizylsäuregehalt von A berechnet, und darauf folgt die endgültige Bestimmung von A. Mittels der Standardlösung B stellt man eine Skala von 7 Gläsern mit zunehmendem Salizylatgehalt her. Der Unterschied zwischen den einzelnen Proben beträgt 0,005 mg Natriumsalizylat ( $= \frac{1}{20}$  ccm der Standardlösung). Jedes Glas enthält 10 ccm Flüssigkeit. Den mittleren Punkt der Reihe bildet der bei der vorläufigen Bestimmung gefundene Wert. Darauf pipettiert man von der zur Bestimmung vorliegenden Lösung A 10 ccm ab, setzt zu jedem Glase in Übereinstimmung mit dem bei der vorläufigen Bestimmung Gefundenen dieselbe Anzahl Tropfen Eisenalaunlösung hinzu und vergleicht nun die Probe mit den Gläsern der Skala bei auffallendem Tageslicht gegen einen weissen Hintergrund. Der Vergleich muss sofort nach dem Zusatz von Eisenalaun angestellt werden.

Bei diesem Verfahren hält sich die Färbung zwar eine Zeitlang unverändert klar violett, beim Stehen kann sie sich jedoch etwas verändern, wenn



auch viel weniger als es bei den Versuchen der Fall war, bei denen das Blut im Soxhlet-Apparat direkt extrahiert wurde, da die Farbe bei so ausgeführten Versuchen schnell einen rötlichen Ton annahm.

Die Eisenalaunlösung muss jedesmal frisch bereitet werden, da es sich gezeigt hat, dass sich die Intensität der Farbe beim Stehen verändert. Ein grösserer Überschuss an Säure verhindert das Eintreten der Farbenreaktion vollständig.

### **Die Bestimmung der Albumosen.**

(Nach Dr. Wolff.)

Wie oben (S. 23) bemerkt wurde, werden die Albumosen von vielen Eiweissreagenzien nicht gefällt. Da andererseits die Phosphormolybdänsäure alles Eiweiss fällt, ist man in die Lage versetzt, durch vergleichende Analysen den Albumosengehalt des Blutes zu bestimmen. Das eigentliche Bluteiweiss wird nämlich quantitativ auch durch die anderen Fällungsmittel koaguliert. Von diesen hat sich die Metaphosphorsäure in Form einer 3,5%-igen Lösung am besten bewährt, da zum Blute zugesetzte Albumosen (und Peptone) sich beinahe quantitativ (genauer zu etwa 90%) in der Metaphosphorsäurelösung wiederfanden. Auch bei Verwendung von Phosphormolybdänsäure erhält man ziemlich genau dieselben Werte bei An- oder Abwesenheit von Albumosen. Albumosenfreies Blut gibt mit Metaphosphorsäure und Phosphormolybdänsäure identische Werte. Bekanntlich geht die Metaphosphorsäure in wässriger Lösung nach und nach in Orthophosphorsäure über. Es hat sich aber gezeigt, dass die Metaphosphorsäurelösung jedenfalls vier Tage lang unverändert bleibt.

### **Die Ausführung der Albumosenbestimmung.**

Die übliche Menge Blut wird in Papier eingesaugt und nach Feststellung ihres Gewichts noch ganz feucht mit 8—10 ccm 3,5%-iger Metaphosphorsäurelösung versetzt. Verwendet man eingetrocknetes Blut, dann verläuft die Extraktion immer unvollständig. Das Proberöhrchen wird mit einem Korkstopfen verschlossen, um zu verhindern, dass die Säure Ammoniak aus der Luft absorbiert; dann lässt man es 18—24 Stunden stehen. So sehr genau kommt es auf die Dauer der Extraktion nicht an, doch darf die Probe nicht 48 Stunden lang mit der Lösung in Berührung bleiben. Nun wird die Lösung, wenn nötig nach Filtration, in den Kjeldahlkolben übergeführt und mit einigen ccm destillierten Wassers nachgespült. Darauf setzt man 2—3 Tropfen Kupfersulfatlösung und 1 ccm Schwefelsäure hinzu und verfährt weiter, wie es oben bei der Mikrokjeldahlbestimmung beschrieben ist. Eine Parallelprobe wird zur Bestimmung des Reststickstoffes mit Phosphormolybdänsäurelösung verwendet. Die Differenz zwischen beiden Werten,



unter Anbringung der sich aus den blinden Versuchen ergebenden Korrekturen, entspricht dem Albumosenstickstoff. Da die Stickstoffmenge nur Hundertstel-Milligramme beträgt, muss man sich des jodometrischen Verfahrens bedienen. Extrahiert man nach der Behandlung mit Phosphormolybdänsäure das Papier zum zweiten Male mit der Metaphosphorsäurelösung, so verläuft die Extraktion nicht ganz quantitativ.

### Gesamtstickstoff.

Für die Bestimmung des Gesamtstickstoffes sowie des Eiweissstickstoffes genügen 20—30 mg Blut. Tatsächlich bekommt man hierdurch noch bessere Werte als bei Verwendung der üblichen Mengen von 100—120 mg. Weiter eignen sich für diese Bestimmung ganz dünne Papierstückchen aus gewöhnlichem Filtrierpapier viel besser als die sonst gebräuchlichen aus Löschpapier. Die Papiere sind etwa  $14 \times 22$  mm gross und wiegen ungefähr 20 mg. Vor dem Gebrauche werden sie mehrmals mit destilliertem Wasser ausgezogen, getrocknet und in einer Flasche mit Glasstopfen aufbewahrt. Nachdem das Blut durch das Papier aufgesogen und gewogen worden ist, wird es in den 50-ccm-Kjeldahlkolben übergeführt, in welchen man vorher 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 1 Tropfen 10%-iger Kupfersulfatlösung sowie 2 ccm 4,5%-iger Permanganatlösung gegeben hat. Infolge der Anwesenheit des Permanganats wird die organische Substanz sehr rasch zerstört. Um Stickstoffverluste auszuschliessen, ist jedoch die Permanganatmenge so gering gewählt, dass sie allein nicht vollständig zur Oxydation ausreicht. Der Rest von Papier und Eiweiss wird durch die Schwefelsäure zerstört. Nach der Verbrennung wird der Stickstoff nach der Mikrokjeldahlmethode wie üblich bestimmt. In die Vorlage werden 2—4 ccm n/200-Schwefelsäure gebracht.

### Gesamteiweiss.

Da der Reststickstoff gegenüber dem Eiweissstickstoff unter gewöhnlichen Verhältnissen in nur sehr unbedeutender Menge (weniger als 1%) vorhanden ist, kann man meistens von dieser Bestimmung absehen. Bei Reststickstoffretention, besonders bei gleichzeitiger Hydrämie aber kann der Reststickstoff bis zu 10% des Gesamtstickstoffs ausmachen. Hier ist infolgedessen die Ermittlung beider Arten von Stickstoff nicht zu umgehen. Das lässt sich aber auch ganz einfach ausführen, indem man die bluthaltigen Papierstückchen am besten nach dem Trocknen an der Luft zuerst mit Phosphormolybdänsäurelösung mindestens 1 Stunde lang extrahiert und dann weiter, wie oben beschrieben, verfährt.



## Albumin und Globulin.

(Nach Dr. R. Fähräus.)

A. Bestimmung beider zusammen. Zu dieser Bestimmung wird Serum verwendet. Man saugt etwa 150 mg Blut aus der Ohrvene oder Fingerkuppe in ein U-förmig gebogenes Kapillarröhrchen auf. (Das Kapillarröhrchen füllt sich mit dem Blut von selbst, wenn es horizontal an die Wunde gehalten wird.) Nach beendigter Koagulation wird das Röhrchen einige Minuten zentrifugiert, wodurch sich das Serum in dem oberen Teil der beiden Schenkel — etwa 30 mg in jedem — ansammelt. Man bricht das Röhrchen beiderseits an der Grenze zwischen Serum und Blutkörperchen ab und bläst vorsichtig 25—30 mg Serum auf ein Papierstückchen von bekanntem Gewicht. Dann wird das Gewicht des eingesaugten Serums festgestellt, mit Phosphormolybdänsäurelösung extrahiert und weiter wie oben verfahren.

B. Getrennte Bestimmung von Albumin und Globulin. Nachdem das Serum in das Papier eingesaugt ist, wird es sogleich, ohne es vorher zu trocknen, in einem Proberöhrchen mit gesättigter, reiner Magnesiumsulfatlösung versetzt. Man muss darauf achten, dass das Papier nicht ganz vollständig vom Serum befeuchtet wird. Nach 24 Stunden — während welcher Zeit man das Röhrchen dann und wann gelinde schüttelt — nimmt man mittels eines mit einem hakenförmigen Platindraht versehenen Glasstabes das Papier heraus, spült es mit einigen Tropfen gesättigter Magnesiumsulfatlösung — die mit der übrigen Lösung vereinigt werden — ab und lässt so weit wie möglich abtropfen. Die letzten Reste saugt man mittels Filtrierpapiers, welches man nur vorsichtig von unten mit dem Papier in Berührung bringt, ab. Schliesslich wird das Papier in den Kjeldahlkolben, der vorher mit Schwefelsäure, Kupfersulfat und Permanganat beschickt ist, übergeführt und verbrannt. Ist das Magnesiumsulfat nicht ordentlich entfernt worden, so stösst der Kolbeninhalt bei der Verbrennung. Geringe Spuren von Salz schaden nichts. Der gefundene Stickstoff, mit 6,25 multipliziert, entspricht dem Globulin. Dieses Verfahren liefert ebenso gute Werte wie jede Makromethode.

Das Albumin ist quantitativ in die Magnesiumsulfatlösung übergegangen. Diese Lösung — etwa 8—10 ccm — wird in einem Zentrifugenrohr mit der gleichen Menge Phosphormolybdänsäurelösung versetzt und zentrifugiert. Das Eiweiss haftet nach dem Zentrifugieren fest an dem Boden des Glases. Die Lösung kann also ohne Verluste von Eiweiss abgegossen werden. Wenn nötig, wird zur Entfernung des Magnesiumsulfats nochmals Phosphormolybdänsäure zugesetzt und die Mischung wieder zentrifugiert. Schliesslich löst man den Niederschlag in einigen ccm 5%-iger Natronlauge und führt die Lösung quantitativ in den Kjeldahlkolben über. Da das Papier hier fehlt,



ist der Zusatz von Permanganat überflüssig. Die Ergebnisse der Albuminbestimmung fallen etwas, obwohl nicht viel, niedriger aus als nach der Makrobestimmung. Sie sind jedoch durchaus brauchbar. Noch bessere Ergebnisse erhält man aber durch Bestimmung des Albumins und Globulins zusammen und Subtraktion des Globulinrestes von der Summe von beiden. Da diese Bestimmung auch viel schneller auszuführen ist, verdient sie unzweifelhaft den Vorzug. 150 mg Blut genügen für beide Bestimmungen.

#### **Fibrinogen, bzw. Fibrin.**

Zur Bestimmung des Fibrinogens wird gewöhnliches Blut — etwa 50 mg — und dünnes Papier verwendet. Nach Aufsaugen des Blutes und nach Wägen desselben wartet man einige Minuten und extrahiert dann die übrigen Blutbestandteile mit 8—10 ccm äusserst verdünnter Lauge in der Kälte. Wenn das Papier nach einigen Minuten farblos geworden ist, wird die Lösung abgegossen und das Papier mit Wasser nachgespült. Dann verbrennt man am besten das ganze Papier zur Bestimmung des Fibrinstickstoffes. Doch kann man auch das Fibrin mittels 8—10 ccm n/100-Natronlauge, unter Erwärmen auf 30—40°, extrahieren und das Extrakt allein verbrennen.

















