

# Medizinisch-chemische Bestimmungsmethoden

Eine Anleitung für Studierende der Medizin  
und für Laboranten

Von

**Dr. Karl Hinsberg**

Vorsteher der Chemischen Abteilung des  
Pathologischen Instituts der Charité Berlin  
Privatdozent an der Universität Berlin

Erster Teil

**Darstellung der allgemein gebräuchlichen und  
der wichtigsten quantitativen Methoden**

Mit 29 Abbildungen



Berlin  
Verlag von Julius Springer  
1935

ISBN-13: 978-3-642-98570-6      e-ISBN-13: 978-3-642-99385-5  
DOI: 10.1007/978-3-642-99385-5

**Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung  
in fremde Sprachen, vorbehalten.  
Copyright 1935 by Julius Springer in Berlin.**

## Vorwort.

Der Zweck des vorliegenden Bändchens ist nur eine *kurze* Anleitung zum chemischen Arbeiten im Krankenhaus-Laboratorium zu geben und es erstrebt in keiner Weise Vollständigkeit in bezug auf die Möglichkeit der Bestimmungsmethoden. Dagegen sollen die gebräuchlichsten Methoden so einfach wie möglich dargestellt und vor allem sollen die theoretischen *Grundbegriffe* für ein quantitatives Arbeiten erläutert werden. Das ganze Werkchen zerfällt in zwei Teile.

1. Darstellung der allgemein gebräuchlichen und der *wichtigsten* quantitativen Methoden.

2. Weitere spezielle Methoden und die Bestimmung von Fermenten und der Wasserstoffionen.

Die Einteilung ist so gewählt, damit jeder, je nach Bedürfnis, sich das notwendige anschaffen kann und der Preis dabei niedrig bleibt. Es ist besondere Rücksicht darauf genommen, jeweils für eine Bestimmung nur eine, höchstens zwei Methoden anzugeben, um eine möglichste Klarheit zu behalten, dafür sind aber auch nur erprobte Methoden dargestellt und es ist bewußt vermieden worden, etwa kolorimetrische Methoden neben titrimetrischen zu bringen, wenn sich letztere als überlegen gezeigt haben, entweder in bezug auf Genauigkeit oder in bezug auf Einfachheit. Das gilt z. B. für den Rest N, wo es keinen Zweck hat nach der Destillation des  $\text{NH}_3$  eine Colorimetrie anzuschließen, während eine Titration rascher und genauer zum Ziele führt.

Wenig gebrauchte Methoden sind nicht aufgenommen, wer sie zu wissenschaftlichen Arbeiten braucht, muß sie in einem der größeren Werke oder im Original nachschlagen.

Um den Umfang der Anleitung nicht unnötig zu steigern, ist von einer Erörterung der mechanischen Handgriffe usw. abgesehen worden. Diese können z. B. in dem kleinen Buch von BERNHAUER,

Einführung in die organisch chemische Laboratoriumstechnik (Berlin: Julius Springer 1934), nachgesehen werden. Die Methodik ist nur dem Prinzip nach dargestellt und im allgemeinen Teil nur das wesentliche hervorgehoben, was erfahrungsgemäß für den erstrebten Zweck notwendig ist. Theoretische Erörterungen sind, soweit dies möglich, vermieden, weil das kleine Buch nur einen praktischen Zweck verfolgt und daher war für die Auswahl der Methode auch die *klinisch* geforderte Genauigkeit maßgebend; an Hand der Anleitung soll jeder, auch ohne akademische Vorbildung, die verschiedenen Bestimmungen durchführen können.

Berlin, im März 1935.

**K. HINSBERG.**

# Inhaltsverzeichnis.

## Allgemeiner Teil.

	Seite
<b>Wägen und Messen</b> . . . . .	1
Analytische Waage . . . . .	1
Torsionswaage . . . . .	4
Behandlung analytischer Niederschläge . . . . .	5
Die Zentrifuge . . . . .	6
Die Normallösungen . . . . .	6
Bestimmung des Titers . . . . .	7
Verdünnen von Lösungen . . . . .	12
Jodometrische Säuretitration . . . . .	12
Indikatoren und Mischindikatoren . . . . .	14
<b>Optische Methoden</b> . . . . .	20
Das Colorimeter . . . . .	20
Das colorimetrische Prinzip . . . . .	22
Die Absolutcolorimetrie . . . . .	26
Nephelometrie . . . . .	33
Elektrisches Photometer . . . . .	35
Polarisation . . . . .	36
Das Eintauchrefraktometer . . . . .	39
Die Prinzipien der Gasanalyse . . . . .	41
Über das Reinigen von Glassachen . . . . .	44
Blutentnahme und Methoden zur Entfernung von Eiweiß . . . . .	46

## Spezieller Teil.

<b>Bestimmungsmethoden für anorganische Bestandteile</b> . . . . .	49
Calcium . . . . .	49
Der Magensaft . . . . .	50
Chloride in Harn und Magensaft . . . . .	52
Chloride im Blut nach RUSZNAK . . . . .	53
Chloride im Blut nach GEYER und ROTSCH . . . . .	55
Ammoniak im Harn . . . . .	56
Bestimmung der Alkalireserve . . . . .	58
Tabelle der Mineralbestandteile nach THANNHAUSER . . . . .	62
<b>Bestimmungsmethoden für organische Bestandteile</b> . . . . .	64
Hämoglobin nach SAHLI . . . . .	64
Rest-N nach PREGL . . . . .	65

	Seite
Rest-N nach HINSBERG . . . . .	70
Gesamt-Stickstoff . . . . .	71
Die Xanthoproteinreaktion . . . . .	72
Harnstoff nach KOWARSKY . . . . .	73
Harnsäure im Blut . . . . .	75
Harnsäure im Harn . . . . .	76
Bilirubin im Serum nach BAKALTSCHUCK . . . . .	77
Blutzucker nach HAGEDORN-JENSEN . . . . .	79
Blutzucker nach CRECELIUS-SEIFERT . . . . .	82
Harnzucker durch Polarisation . . . . .	83
Harneiweiß nach ESBACH . . . . .	84
Cholesterin nach GÖRTZ und RAPPAPORT-ENGELBERG . . . . .	84
Acetonkörper im Blut nach ENGFELD . . . . .	86
Diastase nach WOHLGEMUTH . . . . .	89
Tabelle der normalen organischen Bestandteile im Blut und Harn . . . . .	91
<b>Sachverzeichnis</b> . . . . .	<b>92</b>

## Allgemeiner Teil.

### Die analytische und Torsionswaage.

In der klinischen quantitativen Chemie beherrscht die Titration und Colorimetrie das Feld. Trotzdem sei das prinzipiell wichtige beim Wägen hervorgehoben, da wohl jeder im klinischen Laboratorium einmal in die Lage kommt, eine quantitative gravimetrische Bestimmung machen zu müssen oder sich die Materialien zu einer volumetrischen Flüssigkeit oder Standardlösung einzuwiegen.

Eine gewöhnliche analytische Waage gestattet es im allgemeinen  $\frac{1}{10}$  mg Substanz zu bestimmen. Dafür muß das System des Waagebalkens und der Schalen fast ohne Reibung schwingen, was durch scharfkantige Achatkeile auf Achatplättchen erreicht wird. Diese große Empfindlichkeit hat andererseits den Nachteil, daß die Waage leicht aus dem Gleichgewicht gerät durch unsichtbare Stäubchen, Luftzug usw., weshalb es notwendig ist, vor Staub zu schützen und die Lage des sogenannten Nullpunktes jeweils festzulegen, weil sich durch seine Verschiebung Analysenfehler einschleichen können.

Bezeichnen wir die Skala an einer analytischen Waage nach folgendem Schema,



so sollte der Zeiger der Waage in der Ruhe und unbelastet auf 10 zeigen (Ruhepunkt). Dies tut er nur in den seltensten Fällen, und wenn man zwei Wägungen kurz hintereinander macht, so gleicht sich bei Bestimmung der *Gewichtsdifferenz* der Fehler aus, wenn man die Wägung auf den theoretischen Nullpunkt = 10 bezieht. Liegen dagegen zwischen zwei Differenzwägungen 24 Stunden oder mehr auseinander und wird die Waage gar zwischendurch noch von anderen benutzt, so muß eine eventuell zwischendurch erfolgte Verschiebung des Ruhepunktes berechnet werden, was folgendermaßen geschieht. Man läßt die Waage unbelastet schwingen und notiert die hintereinander folgenden Ausschläge

nach links und rechts (ungerade Zahl) z. B. dreimal nach links und viermal nach rechts, aus denen jeweils das Mittel gezogen wird. Der Mittelpunkt zwischen beiden Mittelwerten ist die Stelle, an der der Zeiger der Waage zur Ruhe gekommen wäre, wenn man sie vollständig ausschlagen läßt. Zum Beispiel

Ausschläge links	Ausschläge rechts	}	nach vorstehendem Skalenschema
	14,9		
4,3	14,8		
4,5	14,6		
4,7	14,4		
Mittel <u>4,5</u>	Mittel <u>14,675</u>		

$$\text{Nullpunkt} = \frac{4,5 + 14,675}{2} = 9,5875$$

~ 9,59 = Ruhepunkt.

Das heißt der Zeiger käme 0,41 Teilstriche links vom theoretischen Nullpunkt (10) zur Ruhe, was bei einer Empfindlichkeit (siehe später) von 2,71 Teilstrichen pro Milligramm eine Differenz von etwa 0,15 mg  $\left(\frac{0,41}{2,71}\right)$  ausmacht. Die Empfindlichkeit bestimmt man, indem man die eine Seite mit 1 mg belastet (Reiter) und in gleicher Weise die Lage des Ruhepunktes festlegt. Zum Beispiel nach 1 mg Belastung rechts.

Ausschläge links	3,5	rechts	10,4
	3,6		10,2
	3,7		10,1
			9,9
	Mittel <u>3,60</u>		Mittel <u>10,15</u>

$$\text{Ruhepunkt: } \frac{3,60 + 10,15}{2} = 6,875.$$

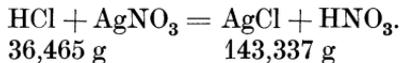
Empfindlichkeit = 9,59 - 6,88 = 2,71 Teilstriche. Findet man nun bei irgendeiner Belastung der Waage den Ruhepunkt oberhalb oder unterhalb von 9,59 Teilstrichen, so bedeutet dies, daß die Gewichte auf den Waagschalen nicht gleich sind und zwar für je 2,71 Teilstriche um je 1 mg differieren. Liegt der *berechnete* Ruhepunkt beim Wägen eines Tiegels z. B. für 13,8730 g bei 9,00, so ist das Gewicht zu groß, da der Nullpunkt um 0,59 Teile nach links verschoben ist, und zwar um  $\frac{0,59}{2,71}$  mg = 0,218 mg, so daß sich das wirkliche Gewicht zu 13,8730 g - 0,218 mg = 13,87278 g, abgerundet 13,8728 g ergibt. In der *Praxis* bestimmt man die

Empfindlichkeit bei jeder Wägung, weil sie von der Belastung der Waage abhängig ist, indem man die Gewichte aussucht, deren Ruhepunkte links und rechts von dem jeweils festgestellten Ruhepunkt bei unbelasteter Waage liegen. Zum Beispiel Ruhepunkt unbelastet 9,74. Linke Waagschale Tiegel, rechte Waagschale Gewichte. Ruhepunkt bei 17,987 g = 10,35. Ruhepunkt bei 17,988 g = 7,62. Empfindlichkeit = 10,35 - 7,62 = 2,73. Abweichung vom Nullpunkt = 10,35 - 9,74 = 0,61. Gewichts-differenz =  $\frac{0,61}{2,73} = 0,223$  mg

wirkliches Gewicht = 17,987 g + 0,223 mg = 17,98722 mg. (Die Differenz muß in diesem Falle zugezogen werden, weil der Ausschlag rechts vom Ruhepunkt lag.)

Bei einiger Übung wird die geringe Mehrarbeit durch die größere Genauigkeit bei weitem aufgewogen, besonders wenn es sich um *geringe* Gewichts-differenzen von einigen Milligrammen bei analytischen Niederschlägen handelt (Phosphate nach EMBDEN oder Cholesterin nach WINDAUS), oder um besonders genaue Einwaagen zur Herstellung von Normallösungen usw.

**Berechnung.** Soll aus dem Gewicht eines Niederschlages, der natürlich bis zum eventuellen Gewicht getrocknet sein muß, die Menge der gesuchten Substanz berechnet werden, so ist es nötig, die Reaktionsgleichung zu kennen. Zum Beispiel man hat gefunden 0,0233 g AgCl, die nach folgender Gleichung entstanden sind.



Es ergibt sich aus den Molekulargewichten, daß 36,456 g HCl immer 143,337 g AgCl geben, demnach entsprechen den gefundenen 0,0233 AgCl

$$\frac{36,456 \cdot 0,0233}{143,337} \text{ g HCl} = 0,2544 \cdot 0,0233 = 0,00593 \text{ g HCl}.$$

Da dieselbe Menge AgCl auch aus NaCl stammen kann, oder aus Chlor-Ionen, wenn man die verfügbaren Cl<sup>-</sup> berechnen will, ergeben sich folgende Beziehungen

$$\begin{array}{l} 0,0233 \text{ g AgCl} = 0,00593 \text{ g HCl} \\ \text{,,} \quad \text{,,} = 0,00951 \text{ g NaCl} = (0,4078 \cdot 0,0233) \\ \text{,,} \quad \text{,,} = 0,005755 \text{ g Cl}^- = (0,2474 \cdot 0,0233). \end{array}$$

Bestimmt man Phosphorsäure, so läßt sich ausrechnen, wieviel die gefundene Menge Niederschlag entspricht: entweder P oder PO<sub>4</sub><sup>≡</sup> oder H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oder P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, wobei jeweils nur der Umrechnungsfaktor im Verhältnis der Molekulargewichte verschieden ist.

*Beispiel:* Man bestimmt Phosphorsäure als Magnesium-Pyrophosphat  $Mg_2P_2O_7$  (Mol. Gew. 222,68). Es entstehen aus je 2 Mol.  $H_3PO_4$  1 Mol.  $Mg_2P_2O_7$ , was bei der Umrechnung zu beachten ist und es ergeben sich folgende Beziehungen: 1 g  $Mg_2P_2O_7$  entspricht:

0,8805 g	$H_3PO_4$	(Mol. Gew. 98,04)
0,8534 g	$PO_4^{\equiv}$	( „ „ 95,02)
0,2786 g	P	( „ „ 31,02)
0,6379 g	$P_2O_5$	( „ „ 142,04)
1,59915 g	$Na_2HPO_4$	( „ „ 178,05)
	$2 \cdot H_2O$	

**Torsionswaage.** Eine besondere Art von Waagen für analytische Zwecke ist die Torsionswaage die nach dem Prinzip der Federwaagen gebaut ist. An einem Haken K (Abb. 1) wird die Waagschale mit dem Wägegut angehängt. Der Haken, der durch eine Feder hochgezogen wird, senkt sich, und seine Bewegung wird durch eine Spiralfeder f auf einen Umzeiger m übertragen. Ferner kann durch den Spannhebel h der Waagebalken wieder ins Gleichgewicht gebracht werden, dabei ist die erforderliche Spannung proportional der Belastung und kann an einer geeichten Skala durch die Stellung von w abgelesen werden. Die Größe der Skala ist in allen Fällen gleich, da-

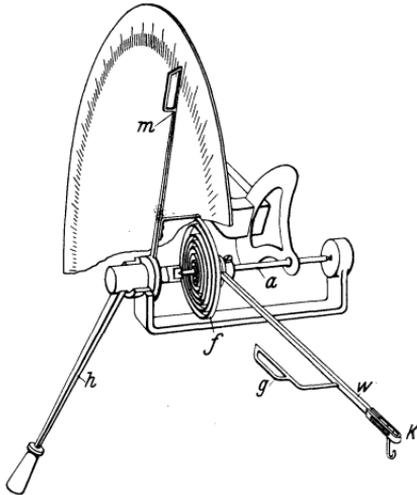


Abb. 1. Schema der Torsionswaage nach HARTMANN und BRAUN, Frankfurt a. M. (Beschreibung im Text.)

gegen der Meßbereich sehr verschieden von 5–1000 mg, so daß im letzteren Falle noch ein Teilstrich = 2 mg ist und im ersteren ein Teilstrich = 0,01 mg ist.

Die Wägung mit einer Torsionswaage ist wesentlich schneller als mit einer Balkenwaage, es ist aber zu beachten, daß die Genauigkeit mit zunehmendem Meßbereich abnimmt, wenn sich auch für gewisse Wägungen, die stets innerhalb eines bestimmten Bereiches liegen, viele Vorteile ergeben; stets bleibt der Meßbereich im Verhältnis zu einer normalen analytischen Waage beschränkt, auch wenn, wie es bei den modernen Typen der Fall ist, verschiedene Meßbereiche auf derselben Waage vorhanden sind.

Für biologisches Material wie z. B. kleine Muskeln oder Blutropfen (Methode BANG) leistet die Torsionswaage unschätzbare Dienste.

**Behandlung analytischer Niederschläge.** Sollen Niederschläge quantitativ bestimmt werden, so ist vor allem nötig, daß sie praktisch unlöslich sind und daß sie restlos aus der Lösung entfernt werden. Dazu filtriert man oder zentrifugiert, letzteres besonders dann, wenn der Niederschlag nicht gewogen, sondern in anderer Weise quantitativ gemessen werden soll.

Beim Filtrieren ist auf dreierlei zu achten:

1. daß der Niederschlag vollständig auf dem Filter zurückgehalten wird (klares Filtrat),

2. daß alles aus dem Fällungsgefäß auf das Filter ausgespült wird und

3. daß alle fremden Substanzen ausgewaschen werden; dazu gehört in vielen Fällen der Überschuß des Fällungsmittels (vgl. Ca-Bestimmung).

Das erste erreicht man, indem man an seinem Glasstab entlang aus dem Fällungsgefäß auf das Filter gießt und das Filter höchstens bis 10 mm vom Rande füllt, weil sonst Teilchen des Niederschlages leicht durch Capillaranziehung an den Trichter gelangen. Auch muß die Teilchengröße den Filterporen entsprechen, was meist durch genaue Beachtung der Fällungsbedingungen erreicht wird. Das quantitative Ausspülen des Fällungsgefäßes geschieht, indem man mit einem Gummiwischer die Gefäßwände abreibt und die Reinheit der Glaswände prüft. Dabei erreicht man gleichzeitig den dritten Zweck, den Niederschlag auszuwaschen. Man prüft ob vollständig ausgewaschen ist, dadurch, daß man in dem aus dem Trichter ablaufenden Waschwasser auf einen leicht nachweisbaren Stoff prüft z. B. bei der Fällung von Ag' mit HCl auf überschüssige Cl<sup>-</sup> durch AgNO<sub>3</sub>, indem man annimmt, daß auch andere etwa vorhandene Salze ausgewaschen sind, wenn keine Cl<sup>-</sup> mehr nachweisbar waren. Ein derartig ausgewaschener AgCl-Niederschlag kann dann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden und aus seinem Gewicht ist die Menge Chlor zu berechnen (vgl. weiter vorne).

Beim Zentrifugieren macht man sich den Unterschied im spezifischen Gewicht zweier Körper zunutze. Auch ohne künstliche Einflüsse würden sich Niederschläge absondern, meist aber langsamer und unvollständiger, entsprechend der Gravitation. Durch die Zentrifuge wird die natürliche Gravitation um ein vielfaches vergrößert, proportional der Umdrehungszahl und dem Trommeldurchmesser. Die Absonderung, meist fester von flüssigen Sub-

stanzen, ist desto schneller, je größer die Tourenzahl, die man u. a. soweit gesteigert hat, daß auch kolloide Substanzen der Sedimentation unterliegen. Derartige in Zentrifugengläsern erzeugte Niederschläge können ebenfalls auf der Zentrifuge ausgewaschen werden, indem sie nach jedesmaligem Zusatz der Waschflüssigkeit und nachdem der Niederschlag aufgewirbelt war, erneut zentrifugiert werden (vgl. Calcium-Bestimmung).

**Zentrifuge.** Für die Vollständigkeit der Abscheidung ist es von Nöten, daß die Zentrifuge ruhig läuft. Dazu müssen ihre Lager in Ordnung und vor allem muß die Trommel *gleichmäßig belastet* sein. Das heißt je zwei gegenüberliegende Gefäße müssen auf einer Waage peinlich genau gegeneinander austariert werden, und man hat sich auch davon zu überzeugen, daß die „Gehänge“ gleich schwer sind. Austarieren kann man meistens leicht, indem man in das eine Glas etwas Lösungsmittel zusetzt.

Eine Zentrifuge darf nie abgebremst werden, weil sonst der Niederschlag durch die Erschütterung aufgewirbelt wird. Von Zentrifugen laufen jene Modelle am ruhigsten und geräuschlosesten, die in Ketten aufgehängt werden. In keinem Fall kann aber von dem Austarieren abgesehen werden und für zweckentsprechende Tarierraagen ist jedenfalls zu sorgen.

Im allgemeinen sind **Normallösungen** im Deutschen Reich in einwandfreier Beschaffenheit zu haben. Trotzdem sollte jeder, der überhaupt quantitativ arbeitet, über die Technik der Herstellung unterrichtet sein, um auch die Möglichkeit der Kontrolle zu haben. Es ist dabei besonders zu beachten, daß die eingewogenen Substanzmengen analytisch rein sind und die *theoretisch geforderte Zusammensetzung* haben, d. h. entweder wirklich trocken sind oder eine *bestimmte Menge* von *Kristallwasser* enthalten.

Die Oxalsäure  $\begin{matrix} \text{COOH} \\ | \\ \text{COOH} \end{matrix}$  z. B. hat das Molekulargewicht 90,016, sie kristallisiert aber mit 2 H<sub>2</sub>O, hat dann das Molekulargewicht 126,048 und für eine normale Oxalsäure braucht man demnach 63,024 g, die aber frisch aus Wasser umkristallisiert (ev. mehrmals) und lufttrocken sein muß, weil sonst ein Teil des Kristallwassers verloren geht. Mit HNO<sub>3</sub> und AgNO<sub>3</sub> darf in verdünnter Lösung kein Niederschlag entstehen. (Sonst verunreinigt mit Chloriden). Oxalsäure hat in der volumetrischen Analyse große Verbreitung gefunden, weil mit ihr sowohl Laugen (Acidimetrie) als auch Kaliumpermanganat (Oxydometrie) titriert werden können, und sie somit als „Urtiter“ Verwendung findet. Andere Substanzen die zur „Titerstellung“ von Säuren verwendet werden können sind:

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  trocken normal = 100,640 g ad 1000 ccm  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  geglüht normal = 52,997 g ad 1000 ccm

Was muß weiter bei einer Normallösung beachtet werden? Die allgemeine Definition lautet: eine Normallösung enthält im Liter 1,008 verfügbaren H<sup>+</sup> oder die diesem H äquivalente Menge eines anderen Stoffes z. B. 8,000 g Sauerstoff oder 35,457 g Cl oder 17,008 g OH<sup>-</sup>. Ein zehntel Normallösung ( $n/_{10}$  oder 0,1 n) enthält dementsprechend nur den zehnten Teil usw. Man kann leicht Normallösungen von Säuren und Laugen mit der nötigen Genauigkeit herstellen, so daß sie innerhalb der Meßmöglichkeiten als richtig gelten können. Zum Beispiel man stellt sich durch Einwiegen eine genau  $n/_{10}$ -Oxalsäure her (6,3024 g ad 1000). Da es nun sehr schwierig ist, ein festgelegtes Gewicht bis auf  $1/_{10}$  mg genau abzuwiegen, hilft man sich folgendermaßen: Man wiegt etwa 50 bis 100 mg mehr als die theoretisch verlangte Menge ab und bestimmt diese genau (siehe weiter oben). Zum Beispiel seien es in diesem Falle 6,3946 g geworden, d. h. 92,2 mg mehr als theoretisch verlangt. Man löst nun in einem Meßkolben, füllt ad 1000 ccm auf und fügt aus einer Bürette noch jene Menge Wasser zu, die für die 92,2 mg notwendig sind. Das sind  $\frac{1000 \cdot 92,2}{6396,6} = 14,41$  ccm, mischt

gut und hat nun im ganzen 1014,41 ccm einer *genau*  $n/_{10}$ -Oxalsäure, wobei das zeitraubende und mühsame Auswiegen kleinster Kristallmengen vermieden ist. Ist eine analytische Wägung nicht möglich, so wiegt man z. B. ungefähr 4,1 g NaOH ab und löst in 1000 ccm Wasser. Wird diese Lösung mit Hilfe von Neutralrot gegen die genau  $n/_{10}$ -Oxalsäure titriert, so werde gefunden für je 10 ccm Lauge:

$$\left. \begin{array}{l} 10,76 \quad 10,70 \quad 10,81 \\ 10,77 \quad 10,80 \quad \text{ccm} \end{array} \right\} \text{Mittel } 10,768 \text{ ccm}$$

d. h., daß je 100 ccm Lauge auf 107,68 ccm verdünnt werden müssen um wirklich  $n/_{10}$  zu sein, und dann 17,008 OH<sup>-</sup> verfügbar im Liter zu enthalten.

**Bestimmung des Titers.** Verzichtet man auf die Verdünnung, so errechnet man einen „Titer“. Da die Natronlauge zu stark ist, sind die Mengen in Kubikzentimeter ausgedrückt, die man gegenüber einer wirklich normalen Säure gebraucht, zu klein. In dem angenommenen Fall brauchte man nur 9,29 ccm um 10 ccm  $n/_{10}$ -Oxalsäure zu neutralisieren. Das heißt alle Titrationswerte, die ich mit der *ungenauen* Lauge erhalte, müssen mit einem Faktor multipliziert werden, um sie auf Werte (in ccm) zu

bringen, die einer wirklich normalen Lauge entsprechen. Dieser Faktor ist  $\frac{10,00}{9,29} = 1,0768$  abgekürzt 1,08.

Allgemein ergibt sich:

der Titer  $> 1$ , wenn Lösung zu stark  
 „ „  $< 1$ , „ „ zu schwach.

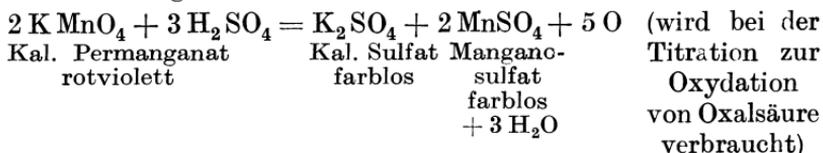
Diese Korrektur ist wichtig, wenn man mit Normallösungen *rechnen* will. Es wird beispielsweise ein unbekannter Teil einer abgemessenen Menge (z. B. 15 cm<sup>3</sup>) n/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durch Ammoniak neutralisiert und der Überschuß durch die eben besprochene Natronlauge ermittelt. So kann man die Menge der Schwefelsäure, die vom Ammoniak neutralisiert wurde nur dann feststellen, wenn die verbrauchte NaOH ebenfalls genau n/10 war oder die Titrationsergebnisse auf n/10 umgerechnet werden. Dazu ist der Titer da.

Beispiel: Vorgelegt 15 ccm n/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, von welcher ein unbekannter Teil durch NH<sub>3</sub> abgesättigt wird. Zurücktitriert 6,360 ccm Natronlauge (Titer 1,08), demnach Verbrauch an n/10-Natronlauge errechnet  $6,360 \cdot 1,08 = 6,87$  ccm oder durch NH<sub>3</sub> verbraucht  $15,00 - 6,87 = 8,13$  ccm n/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hieraus läßt sich erst die Menge NH<sub>3</sub> errechnen.

Eine ganze Reihe von Substanzen, die oft bei Titrationen gebraucht werden, ändern ihren Titer spontan, und werden deshalb nur selten in genauer Normalität zur Verfügung stehen. Hierzu gehören vor allem Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, KMnO<sub>4</sub>, J<sub>2</sub>, während Säuren und Laugen bei richtiger Behandlung „titerbeständig“ sind.

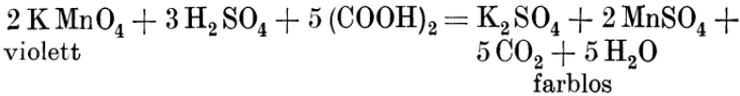
*Der Titer aller Lösungen, die nicht beständig sind, muß vor jedem Gebrauch bestimmt werden.*

Der Begriff Normallösung ist bereits oben festgelegt worden; er erstreckt sich auch auf oxydierende und reduzierende Substanzen. Vom KMnO<sub>4</sub> (Mol. Gew. 158,03) als Oxydationsmittel in *Normallösung* wird verlangt, daß es so viel O<sub>2</sub> im Liter abgibt um 1,008 g H zu H<sub>2</sub>O zu oxydieren, das sind 8 g O<sub>2</sub>. Da nun bei Reaktion in saurer Lösung 2 Mol KMnO<sub>4</sub> 5 Atome O (ergibt 10 Atome H) abgeben (wenn ein O<sub>2</sub> *Acceptor* vorhanden ist) nach der Gleichung:



so folgt, daß man nur  $\frac{2}{10}$  Mol. KMnO<sub>4</sub> zum Liter lösen muß, um eine Normallösung zu bekommen. *Praktisch* wird man grob

31,7 g (=1/5 Mol.) auflösen und den Titer gegen eine genaue Oxal-  
säure bestimmen<sup>1</sup>.



Der geringste Überschuß an  $\text{KMnO}_4$  ist durch die violette  
Farbe der Lösung zu erkennen, und bezeichnet den Endpunkt  
der Reaktion.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die gebräuch-  
lichsten Normallösungen mit Molekulargewichten usw.

Substanz	Mole- kular- gewicht	:	Äqui- valent- gewicht	Beständig- keit des Titers	Bemerkungen
HCl. . . . .	36,465	1/1	36,465	gut	} nur durch Titration zu bestimmen kann genau eingewogen werden
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	98,08	1/2	49,04	„	
(COOH) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .	126,047	1/2	63,023	„	} nur titr.
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	98,04	1/3	32,68	„	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .	105,994	1/2	52,997	„	} kann einge- wogen werden
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O.	381,43	1/2	190,72	„	
NaOH . . . . .	40,005	1/1	40,005	} empfind- lich gegen CO <sub>2</sub>	} nur durch Titration zu bestimmen
KOH . . . . .	56,112	1/1	56,112		
Ba(OH) <sub>2</sub> · 8 H <sub>2</sub> O .	315,50	1/2	157,750	} flüchtig	
NH <sub>4</sub> OH . . . . .	35,047	1/1	35,047		
NH <sub>3</sub> . . . . .	17,031		17,031		
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O .	248,19	1/1	248,19	CO <sub>2</sub> empfindlich	
KMnO <sub>4</sub> . . . . .	158,03	1/5	31,607	} ver- änderlich	} kann genau eingewogen werden
J <sub>2</sub> . . . . .	126,93	1/1	126,93		
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> . . . . .	294,23	1/6	49,038	} gut	
KJO <sub>3</sub> . . . . .	214,03	1/6	35,672		
AgNO <sub>3</sub> . . . . .	169,888	1/1	169,888	} „	} kann einge- wogen werden, nur durch Titration zu bestimmen
NH <sub>4</sub> CNS . . . . .	76,11	1/1	76,11		

<sup>1</sup> 1 Mol = Molekulargewicht einer Substanz in Gramm.

Einige wesentliche Reaktionsgleichungen bei Titrationsen sind folgende:

1.  $\text{HCl} + \text{NaOH} = \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$ .
2.  $\text{H}_2\text{SO}_4 + 2 \text{KOH} = \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ .
3.  $(\text{COOH})_2 + 2 \text{NH}_4\text{OH} = (\text{COO})_2(\text{NH}_4)_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ .
4.  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 = \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .  
fast nicht dissoziiert (neutral)
5.  $2 \text{HCl} + \text{Na}_2\text{CO}_3 = 2 \text{NaCl} + \text{CO}_2 (\text{Gas}) + \text{H}_2\text{O}$ .
6.  $\text{K}_2\text{Cr}_2^{\text{VI}}\text{O}_7 + 6 \text{HJ} + 4 \text{H}_2\text{SO}_4 =$   
 $6 \text{J} + \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Cr}_2^{\text{III}}(\text{SO}_4)_3 + 7 \text{H}_2\text{O}$ .
7.  $2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 2 \text{J} = 2 \text{NaJ} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ .  
mit Stärke blau farblos
8.  $2 \text{KMnO}_4 + 5 (\text{COOH})_2 + 3 \text{H}_2\text{SO}_4 =$   
violett  
 $\text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 5 \text{CO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O}$ .  
farblos
9.  $\text{KJO}_3 + 5 \text{KJ} + 3 \text{H}_2\text{SO}_4 = 3 \text{K}_2\text{SO}_4 + 6 \text{J} + 3 \text{H}_2\text{O}$ .

Die Neutralisation von Natriumborat mit Schwefelsäure geht nur deshalb, weil die Borsäure, die bei der Reaktion frei wird, so wenig dissoziiert ist, daß ihre Ionen nicht stören. Das gleiche gilt bei der Umsetzung zwischen HCl und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , wobei außerdem noch das freiwerdende  $\text{CO}_2$  als Gas entweicht.

Tabelle des Dissoziationsgrades einiger Elektrolyten nach RIESENFELD.

A. Säuren

Säure	Diss. Grad	Säure	Diss. Grad
n/10	%	n/10	%
HCl	etwa 90	Weinsäure (n/32) . . . . .	20
HBr		HF . . . . .	10
HJ		Essigsäure . . . . .	1,300
$\text{HNO}_3$		Kohlensäure . . . . .	0,12
HCNS		Schwefelwasserstoffsäure	0,01
$\text{H}_2\text{SO}_4$ . . . . .	60	Blausäure . . . . . unter	0,007
Oxalsäure . . . . .	31	Borsäure . . . . .	0,007
$\text{H}_3\text{PO}_4$ . . . . .	12		

B. Basen

Base	Diss. Grad
n/10	%
KOH . . . . .	86
NaOH . . . . .	86
$\text{Ba}(\text{OH})_2$ . . . . .	75
$\text{NH}_4\text{OH}$ . . . . .	1,4

Als Titerstellung für n/10-Säuren mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  kann folgende Vorschrift gelten: Man gibt in einen gewogenen Platintiegel 7,0 g chemisch reines  $\text{NaHCO}_3$  und glüht schwach bis zum konstanten Gewicht nach dem Abkühlen. Es ergibt sich z. B. ein Gewicht

von 5,4100 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , die man im Meßkolben auf 1000 ccm löst und gibt dann noch für die überschießenden 0,1103 g 20,8 ccm Wasser mehr dazu, mischt gut und titriert eine abgemessene Menge der Lösung mit Dimethylaminoazobenzol als Indikator bis zur Rotfärbung mit Säure, berechnet eventuell den Titer der Säure.

Der Begriff Normallösung hat sich deshalb so stark eingebürgert, weil sich hierin die verschiedensten Reagenzien *volumenmäßig* einander entsprechen, und eine einfache Rechnung durch Subtraktion gestatten. Deshalb soll im folgenden der Begriff Normallösung nur solchen Lösungen vorbehalten bleiben, die tatsächlich zur volumetrischen (titrimetrischen) Bestimmung eines Stoffes gebraucht werden; aber dort, wo es nicht auf die Normalität, sondern nur auf den ungefähren Prozentgehalt ankommt, sind im folgenden die Konzentrationen in Prozenten angegeben. Wir verstehen also z. B. unter einer  $n/100$  HCl eine solche von genauestens 0,036465%, aber eine 3% HCl braucht nur etwa 3 g HCl in 100 ccm zu enthalten.

Normallösungen werden *immer* im Meßkolben, andere Lösungen mit Hilfe von Meßzylindern hergestellt. Fabrikmäßig hergestellte Normallösungen sollten nur als solche gebraucht und müssen nachkontrolliert werden.

Sehr oft wird auch die Konzentration einer Säure usw. nach dem spezifischen Gewicht angegeben und die nachstehende Tabelle gibt einen kurzen Abriss der wichtigsten Säuren und Basen des Laboratoriums in der Beziehung von spezifischem Gewicht, Prozentgehalt und *ungefährer* Normalität.

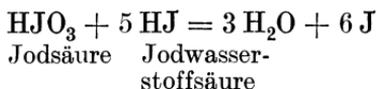
Substanz	Spez. Gewicht 15° C	g in 100 ccm	Ungefähre Normalität	Gewichts- prozent
HCl . . .	1,018	3,6	etwa $n$	3,5
	1,025	5,3	etwa 1,47 $n$	5,1
	1,050	10,7	„ 2,97 „	10,17
	1,090	19,7	„ 5,47 „	18,11
	1,115	25,5	„ 7,09 „	22,9
	1,140	31,5	„ 8,75 „	27,66
	1,190	45,6	„ 12,70 „	38,16
	$\text{H}_2\text{SO}_4$ .	1,020	3,1	etwa $\frac{2}{3}n$
1,030		4,6	etwa $n$	4,49
1,065		10,2	etwa 2,22 $n$	9,47
1,125		19,9	„ 4,32 „	17,66
1,155		24,8	„ 5,39 „	21,55
1,295		50,0	„ 10,90 „	38,61
1,660		100,0	„ 21,80 „	73,81
1,84		184,0	„ 40,00 „	100,00

Substanz	Spez. Gewicht 15° C	g in 100 ccm	Ungefähre Normalität	Gewichts- prozent
HNO <sub>3</sub> . .	1,025	4,7	etwa 0,7 n	4,6
	1,035	6,6	etwa n	6,38
	1,055	10,4	etwa 1,58 n	9,84
	1,200	38,8	„ 5,9 „	32,4
	1,400	91,4	„ 13,84 „	65,3
NaOH . .	1,045	3,96	etwa n	3,79
	1,060	5,5	etwa 1,39 n	4,03
	1,108	10,5	„ 2,66 „	9,5
	1,231	25,4	„ 6,42 „	20,60
	1,397	50,8	„ 12,84 „	36,4
KOH . .	1,045	5,8	etwa n	5,6
	1,075	9,9	etwa 1,71 n	9,2
	1,190	25,5	„ 4,4 „	21,4
NH <sub>3</sub> . .	0,990	1,79	etwa n	1,68
	0,979	5,0	etwa 2,94 n	4,89
	0,958	10,0	„ 5,88 „	9,58
	0,910	25,00	„ 14,73 „	22,78
	0,882	35,00	„ 20,60 „	30,85

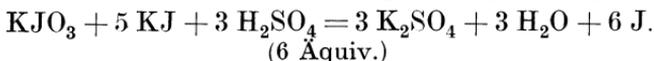
**Verdünnen von Lösungen.** Es ergibt sich nun oft die Notwendigkeit, aus einer konzentrierten Lösung eine verdünnte von bestimmtem Gehalt herstellen zu müssen.

Zum Beispiel man soll aus einer 31,5%igen HCl eine solche von 5% machen. Wie ist dies zu berechnen? Man sucht die Menge der konzentrierten Säure, die 5 g HCl enthält, dies sind  $\frac{5 \cdot 100}{31,5}$  ccm = 15,9 ccm, die auf 100 ccm aufzufüllen sind. Oder man muß 100 ccm der konzentrierten Säure auf  $\frac{31,5}{5} \cdot 100$  ccm auffüllen = 630 ccm. Diese Rechnung ist analog für jede andere Lösung anwendbar.

**Jodometrische Säuretitration.** Die schärfste Titration, weil der Umschlag durch Stärke als Indikator von blau in farblos am besten zu erkennen ist, ist die Jodtitration. Deshalb ist man auch bestrebt, möglichst alle volumetrischen Messungen mit einer Jodbestimmung auszuführen. Um auch Säuremengen „jodometrisch“ erfassen zu können, bedient man sich der Tatsache, daß KJO<sub>3</sub> und KJ in *neutraler* Lösung nicht miteinander reagieren. Kommt dagegen eine Säure hinzu, so wird sowohl HJO<sub>3</sub> wie HJ in Freiheit gesetzt und diese reagieren nach folgender Gleichung (BANGSche Methode)



oder da die Menge Jod proportional der Menge freier *Jodsäure* und Jodwasserstoffsäure ist und diese proportional der Menge zugefügter Säure, läßt sich aus der Menge Jod bestimmen, wie viel Säure vorhanden war. Die Summengleichung ist folgende:



woraus hervorgeht, daß 1 Äquiv.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (=  $\frac{1}{2}$  Mol.) genau 1 Atom Jod in Freiheit setzt, selbstverständlich auch jede andere Säure, ausgenommen sehr schwache Säuren wie Borsäure und Kohlensäure. *Umgekehrt* kann stets auch nur soviel Jod frei werden, wie dem vorhandenen Jodat entspricht, und zwar die im Jodat präformierte sechsfache Menge, so daß man aus einer *abgemessenen Menge KJO<sub>3</sub>* durch einen beliebigen Überschuß irgend einer Säure immer dieselbe Menge Jod erhält (titrierbar mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) und da  $\text{KJO}_3$  genauestens eingewogen werden kann, ist somit die Möglichkeit gegeben, jederzeit eine genau berechnete Menge Jod, die z. B. genau 5 ccm einer  $n_{/100}$ -Jodlösung entsprechen soll, in Freiheit zu setzen, wobei es natürlich bis zu einem gewissen Grade gleichgültig ist, in welcher Menge Flüssigkeit diese Menge Jod gelöst ist. (Wichtig für Titerstellung einer  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung.)

Es ergeben sich also zwei Prinzipien.

1. *KJO<sub>3</sub> + KJ im Überschuß + abgemessene Menge Säure = Jod ist proportional der Säuremenge.*

2. *KJ + Säure im Überschuß + abgemessene Menge KJO<sub>3</sub> = Jod ist proportional der Menge KJO<sub>3</sub>.*

Da aus  $\text{KJO}_3$  durch den Zusatz von KJ die sechsfache Menge des im  $\text{KJO}_3$  vorhandenen Jods frei wird, muß man um eine  $n$ -Jodlösung mit  $\text{KJO}_3$  herzustellen, nur  $\frac{1}{6}$  Mol. ad 1000 ccm auflösen (vgl. Tabelle S. 9).

3. Eine dritte Möglichkeit ist die Bestimmung kleinster Jodmengen. Diese werden nach dem Veraschen mit  $\text{Cl}_2$  zu  $\text{HJO}_3$  oxydiert, das überschüssige  $\text{Cl}_2$  entfernt, und dann mit HJ umgesetzt, so daß man die sechsfache Menge Jod titriert, die ursprünglich vorhanden war.

*Titrimetrische Fällungsreaktionen.* Es gibt noch eine letzte Art von Titrationsanalysen, bei welchen das Reaktionsprodukt ausfällt und die man daher Fällungsreaktionen nennt. Zum Beispiel bei der titrimetrischen Bestimmung des Silbers fällt auf Zusatz des Rhodanids das farblose AgCNS (Silberrhodanid) aus. Der End-

punkt einer derartigen Reaktion ist mit den üblichen Farbstoff-Indikatoren nicht zu erkennen und auch das Fällungsmittel ist farblos, so daß der Endpunkt nur durch Zusatz eines speziellen Indikators, nämlich Ferri-Ionen, die mit überschüssigem  $\text{CNS}^-$  ein gelbrotes lösliches Salz bilden, zu erkennen ist.

Eine ähnliche Anwendung siehe bei der Titration der Chloride mit  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  mit Nitroprussidnatrium als Indikator.

**Indikatoren.** Nun noch ein Wort über Indikatoren. Es ist allen bekannt, daß jeder Indikator seinen Umschlagspunkt bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration hat. Je nach der Art der Titration muß auch der Indikator gewählt sein, und eine Säure oder Lauge die mit einem bestimmten Indikator eingestellt ist, kann auch nur mit diesem Indikator benutzt werden. Desgleichen ist zu beachten, daß der Umschlagspunkt eines Indikators sich ändert, je nachdem ob man mit Lauge in die Säure oder umgekehrt titriert. *Deshalb ist jede Titration in derselben Art und unter Benutzung desselben Indikators möglichst in gleicher Konzentration auszuführen.* Ein Indikator selbst ist meist eine sehr schwache Säure oder Base, dessen Ionen anders gefärbt sind wie der undissoziierte Indikator. Die Ionen des Indikators sind praktisch nur vorhanden, wenn Salzbildung stattgefunden hat und da die Salzbildung besonders bei schwachen Elektrolyten abhängig ist von der Verdünnung, hängt der Umschlagspunkt eines Indikators von der Verdünnung ab, womit gleichzeitig gesagt ist, daß man auf die Konzentration des Indikators und das Flüssigkeitsvolumen achten muß und der Umschlag ist desto schärfer, je stärker die Säure bzw. Base ist; bei Konzentrationen unter  $n/100$  sind gewöhnliche Indikatoren nur schlecht brauchbar. Betrachten wir die Tabelle der Indikatoren (nach SÖRENSEN, Seite 15), so finden wir einen großen Unterschied des Umschlagbereiches und daraus ergibt sich ebenfalls ein gesonderter Anwendungsbereich.

Farbumschlag	Anwendung für
z. B. alkalisch sauer Methylorange gelb — rot	starke Säuren, starke und schwache Basen
Methylrot gelb — violettrot Neutralrot gelb — rot	keine organischen Säuren schwache Basen und $\text{NH}_3$ schwache Basen und $\text{NH}_3$ , organische Säuren
Phenolphthalein rot — farblos	organische u. anorganische Säuren, starke Basen kein $\text{NH}_3$ , $\text{CO}_2$ stört.

## Umwandlungsintervalle nach SÖRENSEN.

	pH	Indikatormenge zu 10 cem	Umschlag	Empfindlichkeit Neutral- salzen gegenüber
Methylviolett . . . . .	0,1—1,5	8—3 Tr.	vorzüglich	sehr empfindlich
p-Benzolsulfonsäure-azo-benzylanilin . . . . .	1,9—3,3	6—3 „	„	wenig empfindlich
p-Benzolsulfonsäure-azo-metachlordiäthyl- anilin . . . . .	2,6—4,0	5—3 „	„	„
Benzol-azo-dimethylanilin, TÖPFFERS Reagens	2,9—4,0	10—5 „	„	„
p-Benzolsulfonsäure-azo-dimethylanilin (Methylorange) . . . . .	3,1—4,4	5—3 „	„	„
p-Benzolsulfonsäure-azo-a-naphthylamin . . . . .	3,5—5,7	12—8 „	„	„
o-Benzolkarbonsäure-azo-dimethylanilin (Methylrot) . . . . .	4,2—6,3	4—2 „	„	sehr wenig empfindlich
p-Nitrophenol . . . . .	5,0—7,0	20—3 „	„	etwas empfindlich
Neutralrot . . . . .	6,8—8,0	20—10 „	gut, schärfer als Rosalsäure	wenig empfindlich
Rosalsäure . . . . .	6,9—8,0	15—6 „	gut	„
Phenolphthaléin . . . . .	8,3—10,0	20—3 „	vorzüglich	etwas empfindlich
Thymolphthaléin . . . . .	9,3—10,5	10—3 „	„	„
p-Benzolsulfonsäure-azo-resorzin . . . . .	11,1—12,7	10—3 „	gut	„

Umwandlungspunkte geeigneter *Mischindikatoren*.

Zusammensetzung der Indikatorlösung	pT
1 Teil Dimethylgelb 0,1% in Alkohol	3,25
1 Teil Methylenblau 0,1% in Alkohol in dunkler Flasche aufbewahren	
1 Teil Methylorange 0,1% in Wasser	4,1
1 Teil Indigocarmin 0,25% in Wasser in dunkler Flasche aufbewahren	
1 Teil Hexamethoxytriphenylcarbinol 0,1% in Alkohol	4,0
1 Teil Methylgrün 0,1%	
1 Teil Methylorange 0,1% in Wasser	4,3
1 Teil Anilinblau 0,1% in Wasser	
3 Teile Bromkresolblau 0,1% in Alkohol	5,1
1 Teil Methylrot 0,2% in Alkohol	
1 Teil Methylrot 0,2% in Alkohol	5,4
1 Teil Methylenblau 0,1% in Alkohol in dunkler Flasche aufbewahren	
1 Teil Bromkresolblau Na 0,1% in Wasser	5,6
1 Teil Alizarinsulfosaures Na 0,1% in Wasser	
1 Teil Chlorphenolrot Na 0,1% in Wasser	5,8
1 Teil Anilinblau 0,1% in Wasser	
1 Teil Bromkresolblau Na 0,1% in Wasser	6,1
1 Teil Chlorphenolrot Na 0,1% in Wasser	
1 Teil Bromkresolpurpur Na 0,1% in Wasser	6,7
1 Teil Bromthymolblau Na 0,1% in Wasser	
2 Teile Bromthymolblau Na 0,1% in Wasser	6,9
1 Teil Azolithmin 0,1% in Wasser	
1 Teil Neutralrot 0,1% in Alkohol	7,0
1 Teil Methylenblau 0,1% in Alkohol in dunkler Flasche aufbewahren	

Nach KOLTHOFF, Biochem. Z. 189.

Saure Farbe	Alkalische Farbe	Bemerkungen
blauviolett	grün	Beim pH 3,4 noch grün, bei pH 3,2 blauviolett, ausgezeichneter Indikator.
violett	grün	Guter Indikator, besonders bei künstlicher Beleuchtung.
violett	grün	Bei pH 4,0 ist die Farbe blauviolett.
violett	grün	
weinrot	grün	Sehr scharfe Farbänderung. Ausgezeichneter Indikator.
rotviolett	grün	Bei pH 5,4 ist die Farbe schmutzig blau, bei pH 5,6 schmutzig grün, bei 5,2 rotviolett.
violett	gelbgrün	Bei pH 5,6 rotbraun, sehr guter Indikator.
grün	violett	Bei pH 5,8 schwach violett.
gelbgrün	blauviolett	Bei pH 5,4 blaugrün, bei 5,8 blau mit Stich ins Violett, bei 6,2 blauviolett.
gelb	violettblau	Bei pH 6,2 gelbviolett, bei 6,6 violett, bei 6,8 blauviolett.
violett	blau	
violettblau	grün	Bei pH 7,0 violettblau, ausgezeichneter Indikator.

Zusammensetzung der Indikatorlösung	PT
1 Teil Neutralrot 0,1% in Alkohol	7,2
1 Teil Bromthymolblau 0,1% in Alkohol	
2 Teile Cyanin 0,1% in 50%igem Alkohol	7,3
1 Teil Phenolrot 0,1% in 50%igem Alkohol Zersetzt sich beim Aufbewahren	
1 Teil Bromthymolblau Na 0,1% in Wasser	7,5
1 Teil Phenolrot Na 0,1% in Wasser	
1 Teil Kresolrot Na 0,1% in Wasser	8,3
3 Teile Thymolblau Na 0,1% in Wasser	
2 Teile Naphtholphthalëin 0,1% in Alkohol	8,3
1 Teil Kresolrot 0,1% in Alkohol	
1 Teil Naphtholphthalëin 0,1% in Alkohol	8,9
3 Teile Phenolphthalëin 0,1% in Alkohol	
1 Teil Phenolphthalëin 0,1% in Alkohol	8,9
2 Teile Methylgrün 0,1% in Alkohol	
1 Teil Thymolblau 0,1% in 50%igem Alkohol	9,0
3 Teile Phenolphthalëin 0,1% in 50%igem Alkohol	
2 Teile Phenolphthalëin 0,1% in 50%igem Alkohol	9,6
1 Teil Naphtholphthalëin 0,1% in 50%igem Alkohol	
1 Teil Phenolphthalëin 0,1% in Alkohol	9,9
1 Teil Thymolphthalëin 0,1% in Alkohol	
1 Teil Phenolphthalëin 0,1% in Alkohol	10,0
2 Teile Nilblau 0,2% in Alkohol	
2 Teile Thymolphthalëin 0,1% in Alkohol	10,2
1 Teil Alizarinengelb 0,1% in Alkohol	
2 Teile Nilblau 0,1% in Wasser	10,8
1 Teil Alizarinengelb 0,1% in Wasser	

Saure Farbe	Alkalische Farbe	Bemerkungen
rosa	grün	Bei pH 7 schmutzig grün, bei 7,2 schwach rosa, bei 7,4 deutlich rosa.
gelb	violett	Bei pH 7,2 orange, bei 7,4 schön violett, Farbe schwächt beim Stehen ab.
gelb	violett	Bei pH 7,2 schmutzig grün, bei 7,4 schwach violett, bei 7,6 stark violett, ausgezeichneter Indikator.
gelb	violett	Bei pH 8,2 rosa, bei 8,4 deutlich violett, ausgezeichneter Indikator.
schwach rosa	violett	Bei pH 8,2 schwach violett, bei 8,4 stark violett.
schwach rosa	violett	Bei pH 8,6 schwach grün, bei 9,0 deutlich violett.
grün	violett	Bei pH 8,8 fahlblau, bei 9,0 violett.
gelb	violett	Farbe von gelb über grün nach violett, ausgezeichneter Indikator.
schwach rosa	violett	Farbe über grün nach violett, ausgezeichneter Indikator.
farblos	violett	Bei pH 9,6 rosa, bei 10,0 violett scharf zu sehen.
blau	rot	Bei pH 10,0 violett, ausgezeichneter Indikator.
gelb	violett	Scharf zu sehen.
grün	rotbraun	

Mitunter ist es praktisch „Mischindikatoren“ zu gebrauchen, um den Umschlag besser erkennen zu können. Zum Beispiel Methylrot + *sehr wenig* Methylenblau. Man sah dann alkalisch die Mischfarbe grün, während bei saurer Reaktion der Mischindikator noch violett umschlägt. Derartige Mischindikatoren besitzen, vielfach besonders bei künstlichem Licht, wesentliche Vorteile. KOLTHOFF gibt die folgende Zusammenstellung; man setzt im allgemeinen dem Indikator einen Farbstoff mit der Komplementärfarbe zu, was sich leicht empirisch ermitteln läßt oder auch aus den Absorptionskurven vorher bestimmt werden kann. Demnach ist es prinzipiell möglich, für alle Indikatoren einen Farbstoff zu finden, der als „Mischindikator“ Verwendung findet. Dabei ist es nicht nötig, daß der zweite Farbstoff auch seine Farbe ändert, er braucht also selbst kein Indikator zu sein, z. B. Methylenblau.

## Colorimetrie.

**Das Colorimeter.** Die Farbtiefe zweier Flüssigkeiten vergleicht man im Colorimeter, welches zuerst von DUBOSQ verwendet wurde.

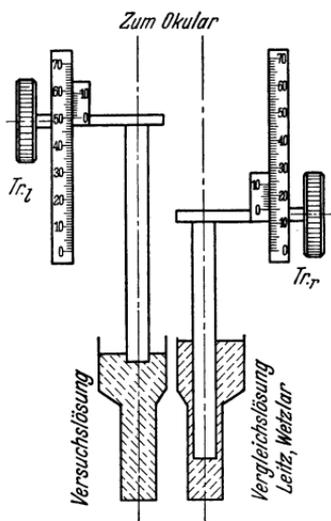


Abb. 2. Colorimeter nach LEITZ, Wetzlar.

Das Prinzip ist folgendes: Das Licht wird gleichmäßig von einem Spiegel durch zwei Glasröhr geworfen, geht durch zwei massive Glasstäbe, gelangt in ein Prisma, durch welches das Gesichtsfeld des Okulars in zwei gleichen halbkreisförmigen Teilen erscheint, ähnlich wie es von den Polarisationsapparaten bekannt ist. Sind die beiden Glasstäbe bis auf den Boden der Becher getaucht oder ist in den Bechern eine *farblose* Flüssigkeit, so erscheinen die beiden halbkreisförmigen Hälften des Gesichtsfeldes bei *gleichmäßiger* Beleuchtung gleich hell. Diese Probe ist vor jeder colorimetrischen Bestimmung zu machen und peinlichst dafür zu sorgen, daß sich *weder* Lichtquelle *noch* Colorimeter bei der weiteren

Arbeit verschiebt. Die Stellung der Glasstäbe ist an einer Skala mit Hilfe eines Nonius bis auf  $\frac{1}{10}$  mm ablesbar (siehe Abb. 2) und zwar wird direkt der Abstand zwischen unterer Kante Glasstab und dem Boden des Bechers *d. h. die Schichtdicke der Flüssigkeit*

angegeben. Sind die Stäbe richtig justiert, so muß bei *gleicher* Konzentration und *gleicher* Schichtdicke einer gefärbten Lösung, beide Hälften des Gesichtsfeldes *gleiche* Helligkeit und Farbe haben. Etwaige Abweichungen, die durch ungleichmäßige Beleuchtung, optische oder mechanische Differenzen in den beiden Strahlengängen bedingt sein können und bei der Einstellung der Glasstäbe nicht mehr als 0,5 mm betragen sollen, werden als additive Fehler bei einer Bestimmung in Rechnung gesetzt. Zum Beispiel: Es sei in beide Tröge dieselbe blaue Lösung eingegossen und der linke Glasstab auf eine Schichthöhe von 20 mm eingestellt, so sollen an der Skala des rechten Glasstabes bei gleicher Farbe und Helligkeit der beiden Hälften des Gesichtsfeldes bei verschiedenen Einstellungen abgelesen werden:

20,3 20,4 20,1 20,5 20,2 20,4 20,2 20,3 20,4 20,2.

Daraus ergibt sich im Mittel 20,3 mm gegen 20,0 mm oder für die rechte Schichtdicke ist stets eine *Korrektur* von  $-0,3$  mm anzubringen. Dieser „Fehler des Colorimeters“, der ebenso gut positiv sein kann, ist vor jeder Messung zu bestimmen. Danach darf bei Tageslichtbeleuchtung oder bei getrennt aufgestellter Lichtquelle die Stellung des Colorimeters nicht mehr verschoben werden, weil sich hierdurch Änderungen in der Lichtverteilung ergeben würden. Man versucht diesem Fehler dadurch zu begegnen, daß man Colorimeter und Lichtquelle fest miteinander verbindet, so daß gegenseitige Verschiebungen nicht mehr eintreten können.

Farben, die sich schlecht vergleichen lassen, werden durch ein eingeschaltetes Farbfilter aus gefärbtem Glas besser colorimetrierbar gemacht. Man kann z. B. einer gelben Lösung durch Einschalten eines blauen Glases einen größeren Farbton geben, der genauer colorimetriert werden kann. Die idealste Lösung ist hier die Anwendung von Filtern, die annähernd monochromatisches Licht durchlassen. Dadurch werden auch Farbnuancen weitgehend ausgeschaltet und man kompensiert die Farbunterschiede, welche leicht bei der Benutzung von empirisch gemischten Vergleichslösungen entstehen. Praktisch erlebt man dies häufig bei der Bestimmung des Hämoglobins mit dem Colorimeter nach HELLIGE oder LEITZ: die Vergleichslösung ist nur in Übereinstimmung mit der Blutprobe bei Tageslicht, bei Lampenlicht entstehen große Farbdifferenzen, die z. B. durch ein Filter vollständig ausgeglichen werden. Allerdings ist dann eine neue Eichung notwendig.

Es versteht sich von selbst, daß sowohl alle Flüssigkeiten *absolut klar* wie auch, daß die Glasstäbe, besonders aber die

*Bodenplatten der Colorimetertröge* peinlichst sauber sein müssen. Man beachte stets, daß sich an der Unterseite der Bodenplatte keine Tropfen oder Flecken befinden.

**Das colorimetrische Prinzip.** Haben zwei *klare* Flüssigkeiten dieselbe Konzentration an einem färbenden Stoff, so haben sie bei gleicher Schichtdicke wie schon oben gesagt, dieselbe Farbtiefe. Ist die Konzentration in einer der Flüssigkeiten kleiner, so muß die Schichtdicke größer sein, um gleiche Farbtiefe (Helligkeit) bei Durchsicht zu erreichen. Zwischen der Konzentration und der Schichthöhe bei gleicher Farbtiefe besteht eine gesetzmäßige Beziehung, ausgedrückt durch das **BEERSche Gesetz**: *Die Schichtdicke ist umgekehrt proportional der Konzentration*, d. h. je stärker die Farbe desto kleiner die Schichtdicke. Nennen wir  $c_1$  und  $c_2$  die Konzentration eines färbenden Stoffes in zwei Flüssigkeiten und es seien die Schichtdicken bei gleicher Farbtiefe im Colorimeter entsprechend  $s_1$  und  $s_2$ , so ergibt sich nach dem **BEERSchen** Gesetz die Gleichung

$$c_1 \cdot c_2 = s_2 : s_1$$

$$c_1 = \frac{s_2 \cdot c_2}{s_1}.$$

Daraus ergibt sich, wenn die eine Konzentration ( $c_2$ ) bekannt ist und die Schichthöhen bei gleicher Helligkeit in einem geeigneten Instrument gemessen wurden, daß die unbekannt Konzentration ( $c_1$ ) berechnet werden kann.

Nehmen wir an die Konzentration ( $c_2$ ) einer bekannten blauen Lösung sei 10 mg%, ihre Schichthöhen, im Colorimeter unter den oben genannten Bedingungen, seien  $s_2 = 20,0$  mm,  $s_1 = 27,7$  mm (Mittel); hiervon muß die Korrektur von 0,3 mm (siehe oben) abgezogen werden und  $c_1$  ist dann  $= \frac{20,0 \cdot 10}{27,4} = 7,3$  mg% oder wenn für eine dritte Lösung  $c_3$  wieder im Vergleich mit  $c_2$  im Mittel 12,8 mm abgelesen werden, so ergibt sich für  $c_3$  nach Abzug der Korrektur:  $c_3 = \frac{20 \cdot 10}{12,5} = 16,0$  mg% usw. *Man merke sich folgendes: Es werden für eine Bestimmung immer mindestens fünf Ablesungen gemacht, daraus das Mittel genommen und die Korrektur entweder zu- oder abgezogen. Die bekannte Vergleichslösung soll so gewählt sein, daß das Verhältnis der Schichthöhen 1:3 nicht übersteigt!*

Das oben Gesagte gilt, solange es sich darum handelt eine Farbe in einem farblosen Lösungsmittel zu bestimmen. Sobald

aber das Lösungsmittel selbst gefärbt ist oder ein gefärbtes Reagens im Überschuß zugesetzt werden muß, bilden sich bei verschiedener Schichthöhe Mischfarben aus, die, weil der Farbton verschieden ist, nicht mehr direkt vergleichbar sind. Man hilft sich hierbei durch die sogenannte *Kompensation*, indem zwei Bechersysteme übereinander gestellt sind und je zwei Glasstäbe immer gleichmäßig verschoben werden, so daß die Schichthöhe in dem oberen Becherpaar oder im unteren Becherpaar stets gleich ist (vgl. Abb. 3). Betrachten wir die Verhältnisse für den Fall, daß eine blaue Farbe in einem gelben Lösungsmittel bestimmt werden soll. Die Mischfarbe ist entweder gelbgrün oder blaugrün, da der Anteil der gelben Farbe *konstant ist pro mm Schichtdicke*, aber natürlich beiderseits verschieden in Erscheinung tritt, da die Schichtdicken verschieden. Nehmen wir an, der Anteil der gelben Farbe betrage 10 Einheiten pro mm und die Konzentrationen der blauen zu bestimmenden Farben verhalten sich wie 5:3, dann ergibt sich im *gewöhnlichen Colorimeter* z. B.

links	30 mm	50 Einheiten gelb +	} gelb } grün
	30 mm	A Einheit blau	
rechts	10 mm	30 Einheiten gelb +	} blau } grün,
	10 mm	A Einheit blau	

d. h. man kann im *gewöhnlichen Colorimeter* keine Farbgleichheit erreichen, höchstens durch Farbfilter (s. oben).

Im *Kompensationscolorimeter* aber wird folgendermaßen verfahren: In den Becher 1a und 2b kommt reines gelbes Lösungsmittel (entweder das gefärbte Reagens oder die Versuchslösung mit Eigenfarbe), in 1b die bekannte Vergleichslösung (gelb mit viel blau) und in den Becher 2a die unbekannte Versuchslösung (gelb mit wenig blau). Wird nun das Glasstäbepaar 1 (Satz I, Abb. 3) auf 30 mm eingestellt und das Glasstäbepaar 2 bei

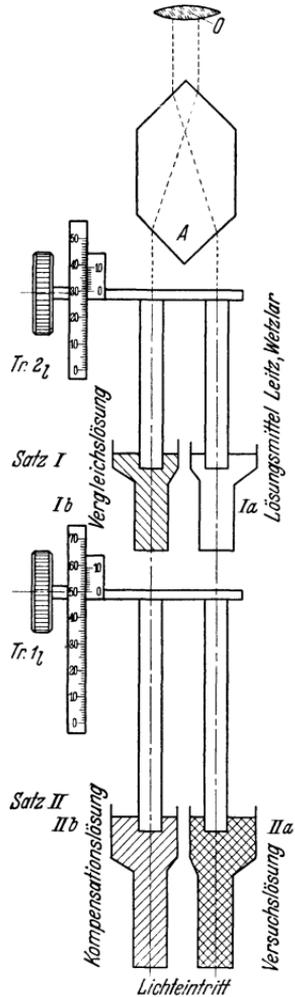


Abb. 3. Kompensationscolorimeter nach LEITZ.

$\frac{5}{3}$ fachem Konzentrationsunterschied von blau auf 50 mm (Korrektur = 0) so haben wir:

links Becher	1a	30 Einheiten	gelb	
	2a	50 Einheiten	gelb	
	A	Einheit	blau	in 50 mm Schichthöhe
	Summe	80 Einheiten	gelb	
	A	Einheit	blau	in 50 mm Schichthöhe
rechts Becher	1b	30 Einheiten	gelb	
	A	Einheit	blau	in 30 mm Schichthöhe
	Summe	80 Einheiten	gelb	
	A	Einheit	blau	in 30 mm Schichthöhe.

Beide Seiten sind immer gleich, unabhängig von dem Konzentrationsverhältnis der gelben und blauen Farbe.

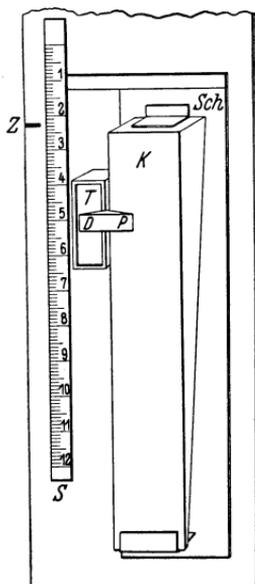
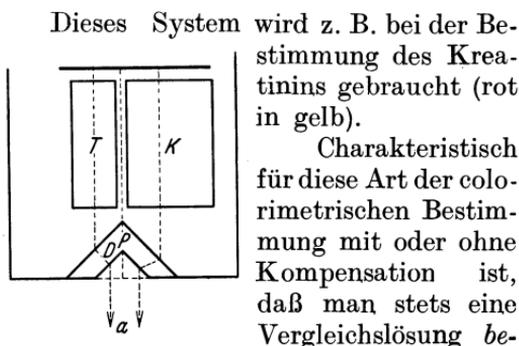


Abb. 4.

Colorimeter nach AUTHENRIETH - KÖNIGSBERGER - HELLIGE, Freiburg i. B.



Dieses System wird z. B. bei der Bestimmung des Kreatinins gebraucht (rot in gelb).

Charakteristisch für diese Art der colorimetrischen Bestimmung mit oder ohne Kompensation ist, daß man stets eine Vergleichslösung *bekannter* Konzentration braucht (Standard), die keine zu große Differenz gegen die unbekannte Lösung zeigt und daß sowohl Standard wie unbekannte Lösung in ganz der gleichen Weise mit Reagenzien versetzt und behandelt werden.

#### Methode AUTHENRIETH - KÖNIGSBERGER.

Man hat die Methode der Colorimetrie mit veränderlicher Schichtdicke abgewandelt, indem man einen Glaskeil K (Abb. 4) mit einer gefärbten Flüssigkeit füllte, die der Farbe der colorimetrischen Reaktion entsprach. Der Glaskeil ist beweglich und seine Stellung an einer Skala S mit Marke Z ablesbar. Neben dem Keil wird eine gleichartig geformte Cüvette T befestigt und die Farbe der Cüvette mit

der des Keiles durch eine Optik DP verglichen (vergl. Abb. 4a). Wird der Keil verschoben, so kann jeder Teil des Keiles neben den die colorimetrische Analyse enthaltenden Trog gestellt werden und bei einer gewissen Stellung wird Farbgleichheit erscheinen. Dieser Punkt der Skala wird vermerkt. Mit Lösungen bekannten Gehaltes wird eine Eichkurve angelegt und man kann durch Vergleich der gefundenen Skalenteile für eine unbekannte Lösung aus der Eichkurve die gesuchte Konzentration ablesen. Vorbedingung ist natürlich, daß die colorimetrische Farbreaktion stets in der gleichen Weise angestellt wird. Für Colorimeter nach AUTHENRIETH-KÖNIGSBERGER ist die Eichkurve eine gerade Linie, jede Änderung um 10 Teilstriche entspricht immer derselben Menge Substanz (z. B. 2 g Hgb). Man spricht in diesem Falle von einer „linearen Beziehung“, im Gegensatz zu einer „logarithmischen“, auf die bei den Absolutcolorimetern noch zurückgekommen wird. Es entfällt die jedesmalige Herstellung der Standardlösung, dagegen ist eine öftere Nacheichung des Keiles erforderlich, da die Füllung des Keiles mit der Zeit ihre Farbe ändert, verblaßt. Die Genauigkeit ist verhältnismäßig gering, weil die Einstellung grob ist und steht hinter dem colorimetrischen Prinzip von DUBOSQ zurück, auch schon weil immer konische Farbabschnitte miteinander verglichen werden müssen. Die Methode wird noch zur Bestimmung von Hämoglobin-Bilirubin verwendet, wo die erreichbare Genauigkeit den Anforderungen der Praxis genügt.

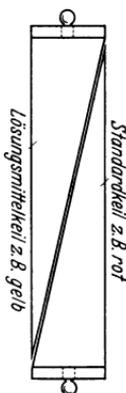


Abb. 5.

Auch eine Kompensationseinrichtung ist für diese Art der Colorimetrie geschaffen worden, indem zwei Keile in umgekehrter Lage hintereinander gelegt werden (siehe Abb. 5). Der eine enthält die Vergleichslösung (Standardheil), der andere das gefärbte Lösungsmittel. Bei der Durchsicht ergibt sich natürlich für jeden Punkt des Doppelkeils eine andere Mischfarbe, was die colorimetrische Bestimmung erleichtert, aber Unterschiede in den Farbtönen vielfach nicht ganz auszuschalten vermag, besonders dann nicht, wenn künstliches Licht verwendet wird. Denn die Füllung des Keils entspricht zwar bei völlig weißem Tageslicht in der Farbe der colorimetrischen Probe, aber bei gefärbtem Licht (Glühbirne oder Gaslicht) sind die Absorptionsverhältnisse anders im Keil als im Trog und es entstehen deshalb Unterschiede im Farbton, die mitunter recht störend wirken.

Haben wir bis jetzt jenen Teil der Colorimetrie besprochen, bei welchem stets eine Vergleichslösung gebraucht wird, so

kommen wir jetzt zu einem Teil, bei welchem Standardlösungen nicht mehr nötig sind, der sogenannten

**Absolutcolorimetrie.** Sie beruht auf dem Prinzip, daß man im *monochromatischen* Licht arbeitet und die Lichtschwächung, die durch eine gefärbte Lösung auf der einen Seite des Instrumentes entsteht, auf der anderen Seite durch eine *meßbare* Abblendung ausgeglichen wird. Der meßbare Grad der Abblendung steht zwar nicht mehr in einem *linearen* Verhältnis zur Konzentrationsänderung, aber man kann durch Messung von acht bis zehn verschiedenen Konzentrationen eine gebogene Kurve (logarithmische Kurve) konstruieren, aus welcher *ein für allemal* alle beliebigen Konzentrationen mit großer Genauigkeit aus der Abblendung abgelesen werden können, ohne jeweils eine Standardlösung herstellen zu müssen, so lange an der Methode nichts geändert wird. Dies ist von entscheidendem Vorteil, weil im klinischen Laboratorium die meist sehr verdünnten Standardlösungen leicht verderblich, oder wie z. B. beim Bilirubin einwandfreie Standardlösungen überhaupt fast nicht herstellbar sind. Deshalb ist es von *überragender Bedeutung*, die Möglichkeit zu besitzen, jederzeit, unabhängig von Standardlösungen, colorimetrische Bestimmungen ausführen zu können. Dem allgemeinen Gebrauch hinderlich ist zur Zeit noch der hohe Preis derartiger Apparate und es wäre zu begrüßen, wenn zwar einfachere dafür aber billigere Instrumente gebaut würden, denn meines Erachtens steht die Präzision, mit welcher diese Instrumente arbeiten, in keinem Verhältnis zur *klinisch verlangten* und *methodisch erreichbaren* Genauigkeit. Es ist zu bedauern, daß sie in vielen Fällen überhaupt nicht beschafft werden können. Die beiden für derartige Messungen zur Verfügung stehenden Apparate sind das *Stufo* bzw. *Polaphot* der Firma ZEISS und das *Leifo* der Firma LEITZ.

Das *Stufo* arbeitet mit zwei symmetrischen Strahlengängen, die vor dem Okular ein Lichtfilter passieren, welches annähernd nur Licht einer Wellenlänge hindurch läßt (vgl. Abb. 6). Die beiden Lichtstrahlen können beiderseitig durch quadratische Blenden abgeblendet werden, wobei auf einer Trommel jeweils ablesbar ist, wie viel Prozent der Lichtmenge zurückgehalten werden. Das Gesichtsfeld, ebenfalls in zwei halbkreisförmige Teile geteilt, ist bei richtiger Justierung und ohne Glasgefäße beiderseits gleich hell. Es kann nun in den Strahlengang links und rechts je ein kleiner Trog (Glasgefäß) mit festen planparallelen Wänden eingesetzt werden, in welchen die zu messende Lösung einerseits und das Lösungsmittel andererseits gefüllt wird. Dadurch erscheint die eine Gesichtshälfte bei richtiger Auswahl dunkler

bei gleicher Farbe, und der Helligkeitsunterschied kann durch Abblenden auf der anderen Seite ausgeglichen werden. Die Trommelablesung ist nur für ein bestimmtes Filter gültig und charakteristisch für die jeweilige Konzentration der Lösung. Diese steht in einem linearen Verhältnis (siehe oben) zur sogenannten Extinktion (aus einer Tabelle ablesbar), aus welcher sich die jeweilige Konzentration berechnen läßt. Das heißt wenn die berechneten Extinktionen sich wie 1:3 verhalten, so stehen auch die entsprechenden Konzentrationen im Verhältnis 1:3. Ist z. B. für eine bekannte Konzentration von 150 mg% die Extinktion

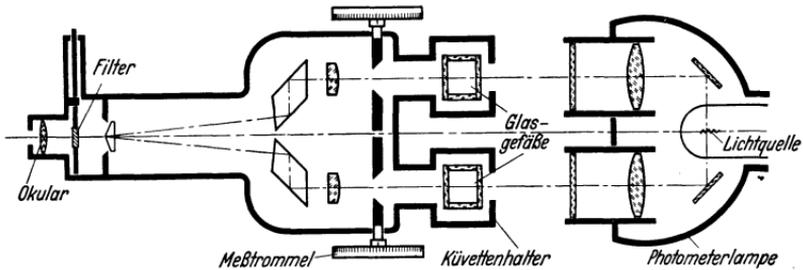


Abb. 6. Stufenphotometer nach ZEISS, Jena.

4,170 gemessen worden und für eine unbekannte Konzentration die Extinktion 1,986, so errechnet sich die gesuchte Konzentration zu

$$x : 150 = 1,986 : 4,17$$

$$x = \frac{1,986}{4,17} \cdot 150 = 71,3 \text{ mg\%}$$

Will man sich aber die jedesmalige Rechnung ersparen, so konstruiert man eine Eichkurve oder Eich-tabelle der folgenden Art, aus der ohne weiteres für einen bestimmten Bereich jede Konzentration abgelesen werden kann (siehe S. 32). Auch wenn Abweichungen von den theoretischen Voraussetzungen (BEERSches Gesetz) vorliegen, sind die so gefundenen Werte immer richtig. Man erspart Zeit, weil das Ablesen von der Kurve sehr rasch geht und vermeidet Rechenfehler, die die jedesmalige Umrechnung aus dem Extinktionskoeffizienten mit sich bringen kann. Ablesungen auf der Trommel, die oberhalb 80 und unterhalb 2% liegen, sind mit Fehlern behaftet, und man soll nach Möglichkeit die Trommelablesungen zwischen 5 und 50% halten. (Der photometrische Einstellfehler liegt dann zwischen 0,3 bis 1,4%.) Danach richtet sich auch die Auswahl der Filter, bei welcher insbesondere darauf zu achten ist, daß beide Gesichtshälften gleiche Farbe zeigen, auch

wenn in den einen Strahlengang eine gefärbte Lösung eingeschaltet ist. Das Filter soll die Farbunterschiede ausgleichen, indem es nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchläßt. Die größten Helligkeitsunterschiede findet man dann, wenn das Filter möglichst viel von dem Licht absorbiert, welches die zu untersuchende Lösung durchläßt. Man probiert bei gleicher Konzentration und Schichtdicke alle Filter hintereinander durch und wählt zur Analyse eines jener Filter, bei welchem die Absorption am größten ist, d. h. bei welchem man am stärksten abblenden

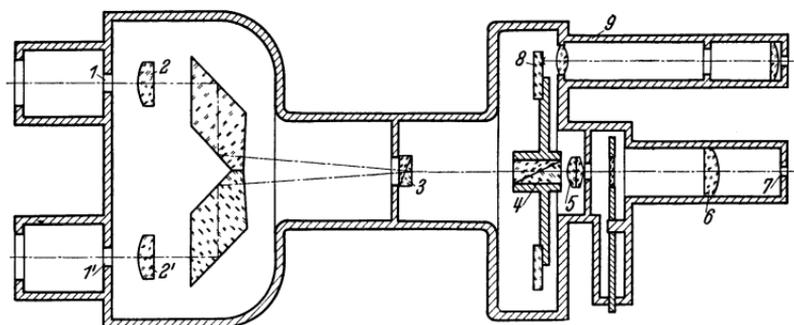


Abb. 7. Schematische Zeichnung des Polaphot ZEISS, Jena.

- |                             |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 u. 1' Photometeröffnungen | 6 Okular                            |
| 2 u. 2' Fernrohrobjektive   | 7 Austrittsblende                   |
| 3 Wollastonprisma           | 8 Teilkreis um die Drehung des Ana- |
| 4 Analysator (NICOL)        | lysators ablesen zu können          |
| 5 Prisma                    | 9 Ablesemikroskop.                  |

muß, um gleiche Helligkeit beider Gesichtsfelder zu erreichen. Zum Beispiel:

Filter	Schichtdicke	Ablesung
445	30 mm	26
460	„ „	30
495	„ „	44
510	30 mm	50
530	„ „	56
550	„ „	54
570	30 mm	51
600	„ „	37
620	„ „	44

Hier ist Filter 530 oder 550 zu wählen:

Das Stufenphotometer ist neuerdings einer Neukonstruktion unterworfen worden, wobei die quadratische Abblendung auf der einen Seite durch ein Nicolsches Prisma ersetzt ist. Das neue Instrument hat den

Namen *Polaphot* (s. Abb. 7) bekommen, und übertrifft das Stufo noch an Genauigkeit. Besonders sind einige technische Verbesserungen angebracht worden, so z. B. Ablesung der Nicol-drehung mit Mikroskop auf einer gravierten Glasscheibe,

die rückwärts beleuchtet ist bis auf  $\frac{1}{100}^0$ . An Präzision braucht dies Instrument nicht mehr übertroffen zu werden, es leistet viel mehr wie übliche Mikrochemische Methoden.

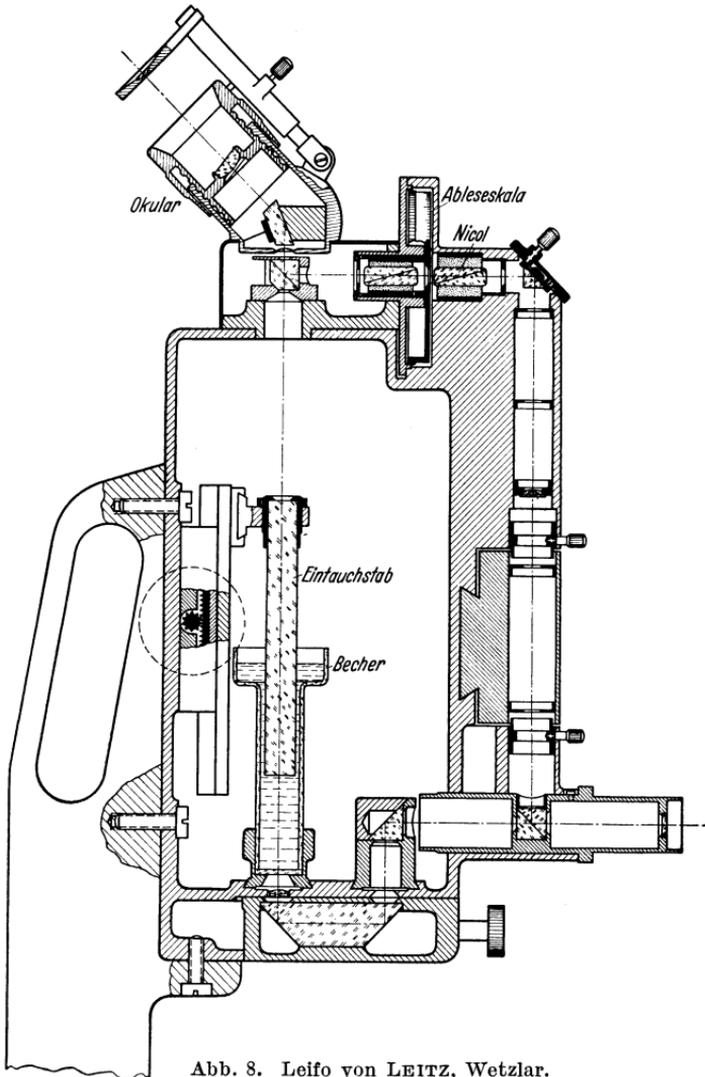


Abb. 8. Leifo von LEITZ, Wetzlar.

Das *Leifo*, ebenfalls ein absolut Colorimeter, hat als erstes die Messung der Lichtschwächung durch Kreuzung von Nicolschen Prismen eingeführt. Wir finden bei diesem Instrument einen un-symmetrischen Strahlengang, der einerseits die zu messende

Lösung, andererseits ein Paar Nicolsche Prismen durchsetzt. Der Strahlengang und das Prinzipielle der Konstruktion ist aus der vorstehenden Abb. 8 zu erkennen. Die Empfindlichkeit ist durch die Verwendung von Nicolschen Prismen sehr groß; da ferner ein einziger Strahlengang nur optisch in zwei Teile zerlegt wird, ist eine Dejustierung nicht zu befürchten und das Einregulieren der Lichtquelle leichter, einfacher und sicherer. Für die zu messende Lösung ist der Becher mit verstellbarem Eintauchstab beibehalten, aber es ist nur noch *ein* Becher nötig, da die in der gefärbten Flüssigkeit stattfindende Lichtschwächung durch Drehung der Nicolschen Prismen ausgeglichen wird im Gegensatz zum gewöhnlichen Colorimeter. Hinter dem Okular passiert das Licht ebenfalls ein Lichtfilter, welches annähernd monochromatisches Licht von der gewünschten Wellenlänge durchläßt und dadurch erscheinen wieder, bei richtiger Wahl des Filters, die beiden Gesichtshälften in der gleichen Farbe (siehe vorher). In dieser Beziehung ist es also dasselbe Prinzip wie beim Stufo, und auch hier läßt sich der Extinktionsmodul oder Koeffizient bestimmen, aus welchem wieder die Konzentration berechenbar ist, praktischer ist es aber, auch in diesem Falle eine Eichkurve anzulegen und aus dieser die Konzentrationen abzulesen. Ich möchte aber besonders hervorheben, und dies gilt für jede Art von Absolutcolorimetrie, daß jede Eichkurve nur gilt:

1. für eine bestimmte Reaktion unter genau festgelegten Bedingungen, wie z. B. Erhitzen, Abkühlen und Mengenverhältnisse der Reagenzien;
2. für eine ganz bestimmte Schichthöhe;
3. für ein ganz bestimmtes Filter.

Die drei Bedingungen sind genau zu beachten und jede Änderung bedingt die Herstellung einer neuen Eichkurve, oder entsprechender Korrektur wie sie ebenso eine neue Bestimmung des Extinktionsmoduls nötig machen würde. Ein Nachteil des Instrumentes ist seine Lichtschwäche, die es fast unmöglich macht mit blauen Lösungen zu arbeiten, es sei denn, daß die Schichtdicke sehr klein genommen wird, wodurch wieder der Ablesungsfehler entsprechend groß wird. Auch geht durch die häufige Reflexion des Lichtes, bevor es den Meßtrog passiert, viel verloren, so daß der gesamte Meßbereich des Nicolschen Prismas nicht ausgenutzt werden kann.

Ich beschränke mich auf diese prinzipiellen Darstellungen bezüglich der einzelnen Apparate, da genaue Gebrauchsanweisungen von den Lieferfirmen bereitwilligst zur Verfügung gestellt werden und deshalb an diesem Platze überflüssig sind.

Da aber in diesen Anleitungen die Methodik der Herstellung von Eichkurven fast nicht behandelt ist, soll hier ein solches Beispiel sowohl für das Stufo wie das Leifo beschrieben werden.

Nehmen wir für das Stufo oder Polaphot als Beispiel die Harnsäure im Serum.

Die erste Frage gilt der Methodik, wir wollen hier die noch später genau zu beschreibende nach BENEDIKT wählen.

Die zweite Frage gilt dem Konzentrationsbereich. Als unterste normale Grenze ist 2,0 mg% anzunehmen und als oberste pathologische Grenze 10 mg%. Ist der Harnsäuregehalt noch größer, kann das Serum verdünnt werden. Nach dem oben Gesagten soll also bei einem Gehalt von 2 mg% die Trommelablesung nicht 2 und bei 10 mg% nicht 80% überschreiten. Danach richtet sich die zu wählende Schichtdicke.

Als Prinzip bei der Herstellung von Eichkurven wollen wir ferner festlegen, daß die Stammsubstanz peinlichst gereinigt und eventuell getrocknet werden muß. Auch die käuflichen Reagenzien „zur Analyse“ sind für diese Zwecke *nicht* rein genug, vor allem feucht. Weiter muß jede Standardlösung, welche zur Herstellung einer Eichkurve dient, denselben Fällungs- und Verdünnungsgang durchmachen, den nachher auch das biologische Substrat durchmachen muß, denn mitunter bewirken diese Zusätze, auch in minimalsten Konzentrationen, eine Beeinflussung der Farbe (besonders bekannt für die colorimetrische Milchsäurebestimmung). Man muß also im vorliegenden Falle die entsprechende Menge der Harnsäurelösung enteiweißen, obschon kein Niederschlag zu erwarten ist. Wir stellen uns nach der Vorschrift von BENEDIKT eine 10 mg% Harnsäure her. Da man zur Bestimmung von Harnsäure 5 ccm Serum verwendet und diese absolut zwischen  $\frac{1}{10}$  bis  $\frac{1}{2}$  mg Harnsäure enthalten, müssen wir in die verwendeten 100 ccm Meßkolben jeweils so viel unserer Standardlösung einfüllen, daß diese Grenzen eingehalten werden. Jetzt stellen wir uns nach der Vorschrift der Methode die beiden Grenzkonzentrationen her, und suchen das passende Filter, welches sowohl bezüglich Farbgleichheit wie auch bezüglich der Einstellung der Trommel unseren Anforderungen genügt. Diese Vorprobe kann grob geschehen und wir wählen beispielsweise das Filter 561, bei einer Schichtdicke von 10 mm. Dabei soll sich die blaue Lösung z. B. im rechten Strahlengang des Instrumentes befinden und die Trommel steht auf 100 (ganz offen). Im linken Strahlengang befindet sich Wasser im Trog und die Ablendung geschieht bis gleiche Helligkeit in beiden Gesichtshälften erreicht ist. Dann nehmen wir z. B. acht Kolben Nr. 1 bis 8 und geben

herein 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 und 5 ccm unserer Standardlösung, füllen mit je etwa 70 ccm Wasser auf, fügen Na-Wolframatlösung und Schwefelsäure hinzu, füllen auf 100 ccm auf und filtrieren, auch wenn es nicht nötig erscheint. Dann pipettiert man von jedem Filtrat je 80 ccm, versetzt sie mit den vorgeschriebenen Reagenzien und colorimetriert nach 5 Minuten. Wir werden die acht Proben nacheinander ansetzen, um die vorgeschriebene Zeit bei allen Proben einhalten zu können. Man findet z. B. bei der Probe 1 folgende Trommelablesungen:

3,2; 3,4; 3,6; 3,0; 3,2; 3,2; 3,1; 3,5; 3,3; 3,5

Im Mittel 3,30

und für die anderen Proben folgende Mittelwerte aus je zehn Ableesungen, von denen je fünf durch Drehen der Trommel von links nach rechts und fünf durch Drehen der Trommel von rechts nach links gewonnen werden.

Probe Nr.	2	3	4	5	6	7	8
Mittel	10,4	14,4	19,6	25,5	38,6	53,5	73,0
Zweite Probe	10,6	14,3	19,2	25,9	39,0	53,0	74,0

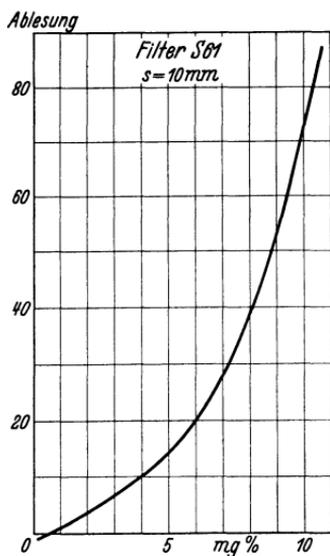


Abb. 9. Eichkurve für das Stufu. Harnsäurebestimmung im Serum BENEDIKT.

Man wird dieselbe Messung nochmals wiederholen, indem der Glastrog mit der Analysenlösung jetzt links steht, und bei genügender Übereinstimmung mit der ersten Messung die Kurve der Abb. 9 zeichnen können, aus der ohne weiteres abzulesen ist, daß ein Serum, welches in gleicher Weise behandelt ist und bei welchem die Trommelablesung im Mittel 15,5 ist, einen Harnsäuregehalt von 5,2 mg% haben muß usw.

Mit dem Leifo machen wir es ähnlich und wählen als Beispiel eine colorimetrische Blutzuckerbestimmung nach URBACH, die zwar ursprünglich für das Stufu ausgearbeitet war, aber natürlich auch für das Leifo verwendet werden kann. Wir müssen messen können für einen Bereich von 50 bis 350 mg% und finden, daß hier das Filter 53 geeignet ist bei einer Schichtdicke von 15 mm. (Die Methodik kann Interessens halber nachgelesen werden in Biochem. Z. 1933, 265, 390.) Wir stellen Glucoselösungen in der

gewünschten Konzentration her und behandeln sie so als ob es Blut wäre, geben die Reagenzien zu, kochen und lesen innerhalb  $\frac{3}{4}$  Stunden wie vorgeschrieben ab. Aus je zehn Ablesungen nehmen wir das Mittel und finden folgende tabellarisch zusammengestellten Werte.

Konzentration  
der Lösung

mg % Glucose 15 30 50 70 150 200 250 300 350

Mittel der

Ablesungen 35,8 33,75 31,6 29,5 22,2 19,0 16,7 14,2 12,4.

Diese Werte in Kurvenform angeordnet ergibt die Kurve Abb. 10, aus der jede beliebige Konzentration eines gleich behandelten Blutes bestimmt werden kann.

Es versteht sich von selbst, daß zur Anlage derartiger Eichkurven besondere Sorgfalt verwendet werden muß. Fehler in der Methodik oder Ablesung verraten sich dadurch daß der betr. Punkt außerhalb der Kurve liegt.

### Nephelometrie.

Nachdem wir die colorimetrischen Methoden zur Bestimmung des Farbgehaltes einer

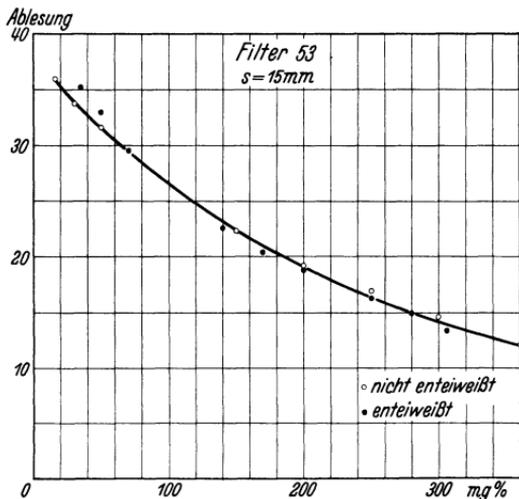


Abb. 10. Eichkurve für das Leifo, Blutzuckerbestimmung nach URBACH.

optisch klaren Lösung kennen gelernt haben, wollen wir noch kurz die Methoden streifen, die die kolloidale Trübung einer Lösung zu messen gestatten. Eine derartige Messung unterscheidet sich von der Farbcolorimetrie dadurch, daß nicht das durchgehende sondern *abgebeugte* Licht gemessen wird. Und zwar ist es so, daß desto mehr Licht abgelenkt wird, je mehr Teilchen vorhanden sind. (Tyndall-Phänomen.) Die prinzipielle Anordnung ist folgende. Abb. 11. In ein Becherglas, welches eine kolloidal getrübe Lösung enthält, fällt seitlich ein Lichtstrahl, wodurch das Gesichtsfeld a des Okulars durch das abgelenkte Licht erhellt erscheint. Eine Mattscheibe (Vergleichshelligkeit) wird von der gleichen Lichtquelle beleuchtet und dadurch erscheint das Gesichtsfeld b im Okular

ebenfalls erhellt. Die Belichtung des Gesichtsfeldes kann durch die beiderseitigen Meßtrommeln abgeblendet werden und man hat die Möglichkeit in ähnlicher Weise wie beim Stufu eine Eichkurve zu konstruieren. Wird das Becherglas durch einen geeichten *trüben* Glaskeil ersetzt, so ist man in der Lage die Trübungswerte in absoluten Einheiten zu bestimmen. Es werden sich die gemessenen Helligkeiten verhalten, wie die Zahl der Teilchen bei gleicher Teilchengröße oder wie die Konzentration des Stoffes, aus welchen die Teilchen entstanden sind. Ist das Gesichtsfeld der Versuchslösung heller als die Vergleichshelligkeit, so muß ich abblenden und kann alsdann aus dem Grad der Ablendung, ähnlich wie bei der Colorimetrie am Stufu oder Leifo, die Konzentration der Versuchslösung aus einer Eichkurve oder dergl. berechnen. Die

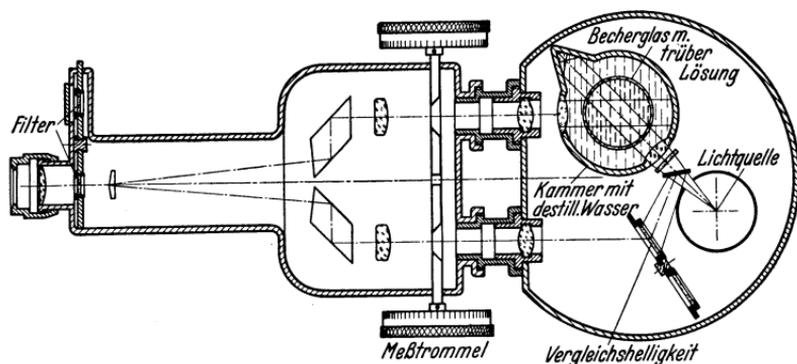


Abb. 11. Das Stufu von ZEISS als Trübungsmesser (Nephelometer).

Originalkonstruktion nach KLEINMANN arbeitet mit verschiedenen Schichthöhen ähnlich wie das Prinzip von DUBOSQ, worauf nur hingewiesen sei, das Polaphot oder Leifo als Nephelometer gebraucht nach dem Prinzip der Ablendung. Aus der Tatsache, daß die *Zahl* der kolloiden Teilchen von ausschlaggebender Bedeutung für die Nephelometrie ist, ergibt sich schon die Schwierigkeit, reproduzierbare Werte zu erhalten. Die nephelometrisch zu messenden Trübungen sind alle kolloidaler Natur und bei der Herstellung dieser Trübungen, die naturgemäß von der Salzkonzentration, dem  $p_H$ , Temperatur und dergl. abhängig sind, muß deshalb *besondere Sorgfalt* angewendet werden, zumal der kolloidale Charakter auch von der Art der Fällung abhängig ist. Diese Schwierigkeiten sind nicht zu unterschätzen und sehr leicht können riesige Fehler entstehen durch scheinbar nebensächliche Umstände z. B. Glassorten. Deshalb hat im klinischen Laboratorium die Nephelometrie fast keine Anwendung gefunden und auch das

Cholesterin wird lieber mit einer umständlichen gravimetrischen Methode bestimmt als mit der nephelometrischen, obschon ganz besonders ZEISS im Polaphot durch einen getrübbten Glaskeil einen ausgezeichneten Vergleichsstandard geschaffen hat, der auch *absolute* Trübungswerte anzugeben gestattet. Ich nehme aus obigen Gründen davon Abstand, ein besonderes Beispiel zu bringen.

Das Instrument ist auch zur quantitativen *Fluorescenzmessung* geeignet, was für einige Spezialfälle in Betracht kommt.

*Elektrisches Photometer.* Einen weiteren Schritt, sich von subjektiven Beobachtungsfehlern bei der Colorimetrie unabhängig zu machen, ist durch Einführung der

lichtelektrischen Zelle in ein Colorimeter von Dr. B. LANGE versucht worden. Der Apparat (Abb. 12) enthält ein sehr empfindliches Ampèremeter (10), an welches in Serienschaltung zwei lichtelektrische Zellen 4 und 5 angeschlossen sind, die keinen Strom liefern, solange beide Zellen gleichmäßig von einer Lichtquelle 1 aus beleuchtet werden. Wird aber in den einen Strahlengang (vgl. Abb. 12) eine gefärbte Lösung eingeschaltet (Trog 3),

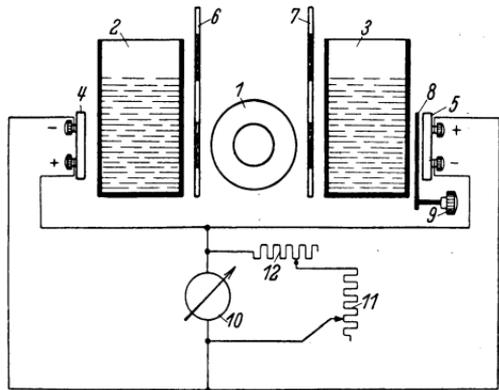


Abb. 12. Schematischer Aufbau des elektrischen Colorimeters nach Dr. B. LANGE.

- 1 Glühlampe 40 Watt.
- 2 Cuvette mit Lösungsmittel.
- 3 Cuvette mit Farblösung.
- 4 u. 5 Photozellen.
- 6 u. 7 Auswechselbare Filter.
- 8 Verschlussklappe für Photozelle 5, zum Justieren des Gerätes.
- 9 Drehknopf zur Verschlussklappe 8.
- 10 Mikroampèremeter.
- 11 und 12 Drehwiderstände zum Justieren.

welche einen Teil des Lichtes absorbiert, so wird ein Strom fließen und die Ausschläge am Ampèremeter stehen in einer logarithmischen Beziehung zu der Konzentration der Farbe. Damit ist theoretisch die Möglichkeit gegeben, Farbkonzentrationen vollkommen objektiv zu messen, denn der Beobachter hat, nachdem das Instrument justiert ist, weiter nichts zu tun, als aus einer speziellen empirisch gefundenen Tabelle oder Kurve, die der Spannung entsprechende Konzentration abzulesen, bzw. über den Extinktionskoeffizienten die gesuchte Konzentration zu berechnen.

Praktische Erfahrungen liegen bisher über das Instrument im klinischen Betriebe nur wenig vor. Die Handhabung ist prinzipiell

dieselbe, wie bei den Absolut-Colorimetern beschrieben. Die Eichkurven haben dieselbe Form, und auch die Anwendung von Farbfiltern ist möglich. Der Preis ist im Verhältnis zu den optischen Instrumenten gering, seine Brauchbarkeit muß sich erst erweisen.

Deshalb möge dieser kurze Hinweis genügen.

**Polarisation.** Die Lösungen organischer Substanzen mit sogenannten asymmetrischen Kohlenstoffatomen haben die Eigenschaft, die Schwingungen des polarisierten Lichtes aus ihrer Richtung abzulenken. Die Ablenkung kann sowohl nach links wie nach rechts erfolgen, dies ist abhängig von der Art der Substanz und ebenso auch die Größe der Ablenkung in Graden gemessen. Deshalb spricht man auch von der Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes. Weiter sind neben der Natur des betreffenden Stoffes für die Größe der Drehung maßgebend: die Konzentration des Stoffes mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen in der Lösung, die Länge der Schichtdicke, welche von dem polarisierten Licht durchsetzt wird, die Temperatur der Lösung, die Wellenlänge des Lichtes und die Art des Lösungsmittels. Im Zusammenhang mit dem Zweck des Buches interessiert wesentlich nur der Zucker als „optisch aktive Substanz“ und weiter nur apparative Einrichtungen, die für diagnostische Zwecke mit genügender Genauigkeit arbeiten.

Das gewöhnliche Licht stellt eine elektromagnetische Schwingung dar, stets senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung aber in allen denkbaren Ebenen. Das polarisierte Licht dagegen hat die Eigenschaft nur in *einer* Ebene zu schwingen und wird u. a. erzeugt durch gewisse Kristalle, die die Eigenschaft haben, von normalem Licht nur Licht einer bestimmten Schwingungsrichtung durchzulassen, d. h. polarisiertes Licht zu erzeugen. Man benutzt in der Praxis Kalkspatprismen (Nicolsche Prismen), die mit Canadabalsam zusammenge kittet sind und bei denen die Endflächen der natürlichen Rhomben auf  $68^{\circ}$  abgeschliffen sind. Dadurch wird der sogenannte ordentliche Strahl durch Totalreflexion abgelenkt und nur der außerordentliche Strahl durchsetzt als polarisierter Strahl das Prisma. Die Lage der Schwingungsebene des polarisierten Strahls ist abhängig von der Lage der optischen Achse der Kalkspatprismen und solange ein weiteres Prisma mit *gleich gerichteter* optischer Achse in den Gang des polarisierten Strahles gestellt wird, geht das Licht ungehindert hindurch. Wird das zweite Prisma aber um  $90^{\circ}$  gedreht, so herrscht völlige Dunkelheit, weil nun das zweite Prisma für das polarisierte

Licht des ersten Prismas undurchgängig ist. Für alle Zwischenstellungen zwischen 0 und  $90^{\circ}$  erfolgt eine teilweise Abblendung. Sind nun die Prismen I und II gleichgeschaltet und wird zwischen die beiden Prismen eine Lösung eingeschaltet, die die Ebene des polarisierten Lichtes zu drehen vermag, so müßte das zweite Prisma (Analysator) um einen bestimmten Betrag gedreht werden, nun wieder volle Helligkeit erzeugen. Da aber diese Stellungen von unserem unvollkommenen Auge nur schwer erkannt werden können, hat man Halbschattenapparate konstruiert, bei denen das Gesichtsfeld des Okulars in zwei Teile zerfällt, von denen der eine Teil durch ein fest eingebautes und nur einen Teil des Lichtstrahles verdeckendes drittes Nicolsches Prisma halber Länge etwas abgedunkelt ist. Die Helligkeit dieses Teiles des Gesichtsfeldes dient als Vergleich. Das dritte

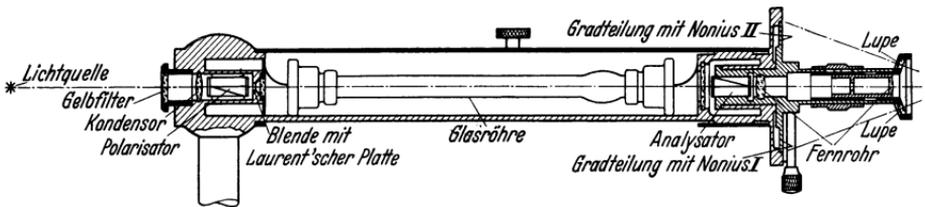


Abb. 13. Polarisationsapparat nach ZEISS zur Zuckerbestimmung.

Prisma ist in der Abb. 13 als Laurentsche Platte eingezeichnet, die denselben Zweck hat und in älteren Apparaten Verwendung fand.

Der Aufbau eines Polarisationsapparates ist vorstehend schematisch dargestellt (Abb. 13). Das Licht geht, abgesehen von verschiedenen Blenden, erst durch ein Gelbfilter, dann durch einen Kondensator; danach durch das erste polarisierende Nicolsche Prisma (Polarisator), im untern Teil durch das dritte Prisma (Laurent'sche Platte), welches den Halbschatten erzeugt und nachdem es die Glasröhre mit der zu messenden Lösung passiert hat, durch den „Analysator“, welcher um seine Längsachse drehbar angeordnet ist und dessen Drehung an einer Skala mit Gradteilung und Nonius auf  $\frac{1}{10}^{\circ}$  ablesbar ist. Das zwischen den Prismen 1 und 3 liegende Rohr ist beiderseits mit planparallelen Platten abgeschlossen und genau 189,4 mm lang weil dann für die Zuckerbestimmung  $1^{\circ}$  Drehung = 1% Dextrose ist. Wird das Rohr nur 94,7 mm lang genommen, so sind die abgelesenen Werte mit zwei zu multiplizieren. Zum Schluß kommt ein Fernrohr mit Lupe, durch welche die Trennungslinie

des Gesichtsfeldes scharf eingestellt werden kann, und mit dessen Hilfe die gleichmäßige Beleuchtung, unter Drehung des Analysators, beobachtet wird.

Als Lichtquelle soll eigentlich das gelbe Licht der Natriumlampe, neuerdings die elektrische Natriumlampe von Osram, genommen werden, für klinische Zwecke genügt aber ein gelbes „passendes“ Filter, welches in die neueren Apparate die speziell zur Harnzuckerbestimmung gebaut sind schon eingebaut wird (vgl. Abb. 13). Solche kleinen handlichen und wohlfeilen Apparate gestatten Ablesungen bis auf 0,1% Zucker, was für praktische Zwecke völlig ausreicht und werden von allen großen Firmen in gleicher und guter Qualität geliefert.

Die Messung geht in der Weise vor sich, daß das Polarisationsrohr mit der klaren Lösung gefüllt wird ohne daß Luftblasen im

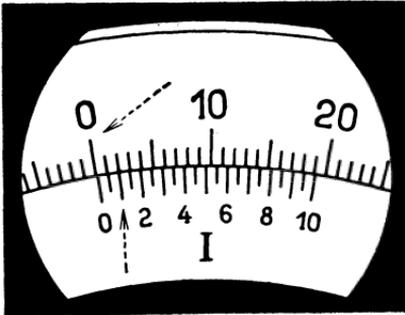


Abb. 14a. Nonius in Anfangsstellung.  
Ablesung + 0,1°.

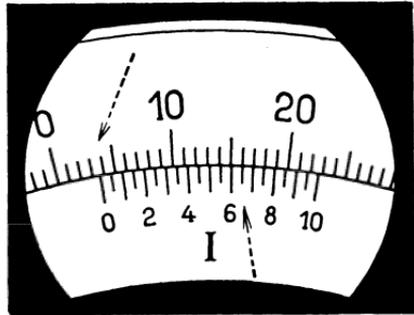


Abb. 14b. Gebrauch des Nonius.  
Ablesung + 3,65°.

Rohr bleiben. Das Instrument wird geprüft ob leer bei gleicher Beleuchtung der beiden Gesichtshälften die Gradeinteilung auf 0,0 steht und eine eventuelle Abweichung wird bei den späteren Messungen berücksichtigt. Dann wird das gefüllte Rohr eingelegt und bei gleicher Helligkeit des Gesichtsfeldes die Drehung an der Kreisteilung abgelesen, die sofort den Prozentgehalt Zucker angibt.

**Der Nonius.** An Polarisationsapparaten, Colorimetern und dergl. wird, um die zehntel Teile bzw. Grade abzulesen der Nonius benutzt. Seine Handhabung ist einfach und beruht auf folgendem Prinzip: Es ist z. B. die Strecke von 19 Teilen der Hauptteilung an einer verschiebbaren zweiten Teilung (Nonius) in 10 Teile geteilt (Abb. 14 a). Stehen beide Marken aufeinander, so stehen nur noch die Marken 19 der einen und 10 der anderen Teilung einander gegenüber. Alle anderen sind  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{2}{10}$ ,  $\frac{3}{10}$  usw. Teile

nach rechts verschoben. Stehen die Nullmarken nicht aufeinander oder ist der Nullstrich des Nonius nicht gegenüber einer anderen Zahl der Hauptteilung, so muß ein anderer Teil des Nonius mit der Hauptteilung gegenüber stehen und die Nummer dieser Teilung des Nonius gibt gleichzeitig an um wieviel zehntel Teilstriche der Nullpunkt des Nonius nach rechts verschoben ist.

Nehmen wir als Beispiel Abb. 14 b. Die Nullmarke des Nonius steht zwischen 3 und 4<sup>0</sup> und es deckt sich der 6,5te Teil mit der Hauptteilung. Ablesung  $+ 3,65^{\circ}$ . Natürlich kann auch eine Einteilung 10:9 oder 5:4 Teilen erfolgen, wodurch die Ablesung entsprechend ungenauer wird.

**Eintauch-Refraktometer.** Die Liste der optischen Hilfsinstrumente im medizinischen Laboratorium wäre unvollständig, würde nicht auch das *Refraktometer* erwähnt, welches meistens zur quantitativen Bestimmung der gelösten Eiweißmenge gebraucht wird. Prinzipiell läßt sich mit dem Refraktometer die Konzentration jedes gelösten Stoffes in einem beliebigen Lösungsmittel bestimmen, indem die Grenzlinie der totalen Reflexion beobachtet wird, die ihrerseits von dem Brechungsindex bzw. der Konzentration der Lösung abhängig ist, und zwar nimmt der Brechungsindex einer Lösung mit zunehmender Konzentration zu. Da im Serum oder Plasma die anorganischen Salze und organischen Kristalloide gegenüber dem Eiweiß nur mit einem verschwindenden Betrag an dem Brechungsindex beteiligt sind, kann der an einer Skala abgelesene Wert direkt zu dem Eiweißgehalt bzw. Brechungsindex in Beziehung gesetzt werden.

Der Aufbau bzw. Strahlengang des Instrumentes ergibt sich aus der nebenstehenden Skizze (Abb. 15). Das Prisma  $P_1$  wird in den Becher B mit der zu untersuchenden Lösung getaucht und das ganze in einem Temperiertrog auf die gewünschte Temperatur gebracht, die meist  $17,5^{\circ}\text{C}$  ist und an einem in  $\frac{1}{10}^{\circ}$  geteilten Thermometer kontrolliert wird. Der Temperatenausgleich zwischen Bad, Lösung und Prisma dauert einige Minuten. Der Lichtstrahl durchsetzt weiter einen Prismensatz A und ein Objektiv OB und bildet auf einer im Okular OK sichtbaren Skala eine scharfe

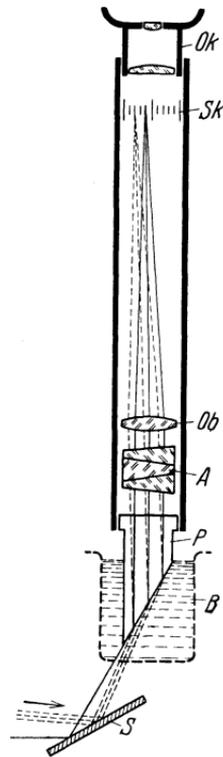


Abb. 15. Schematischer Schnitt durch das Eintauchrefraktometer, ZEISS.

Schattengrenze aus. Die Grenzlinie soll scharf und ohne farbige Ränder sein. Ist dies bei gewöhnlichem Tageslicht mit dem Kompensator R (Abb. 16) nicht zu erreichen, so nimmt man eine schwache elektrische Lampe, das Licht der Natriumlampe oder ein gelbes Filter zu Hilfe.

Man stellt nun mit der Mikrometerschraube Z die Schattengrenze im Gesichtsfeld (Abb. 17) auf einen ganzen Teilstrich und kann dann an der Einteilung der

Mikrometerschraube die Skalenteile bis auf 0,1 Teile ablesen und 0,01 Teile schätzen. Aus der zugehörigen Tabelle ist der zugehörige Eiweißwert ohne weiteres zu ersehen und auch mit Hilfe der Interpolationstabellen die Zwischenwerte für die zehntel

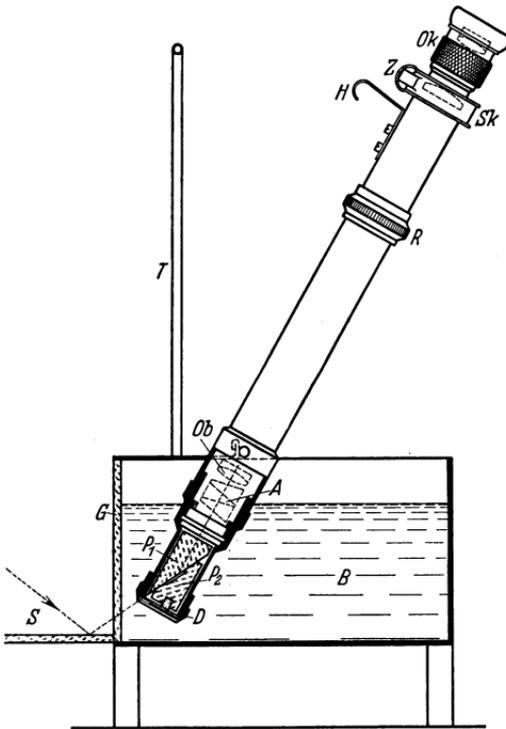


Abb. 16. Eintauchrefraktometer ZEISS mit Hilfsprisma.

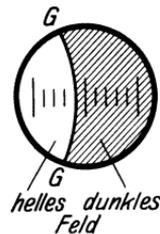


Abb. 17. Gesichtsfeld des Eintauchrefraktometers.

Skalenteile an Hand des angeführten Zahlenbeispiels zu errechnen.

Bevor das Instrument in Gebrauch genommen wird, muß es geprüft bzw. justiert werden. Zu dem Zweck füllt man den Becher mit destilliertem Wasser und beobachtet ob der Trennungsstrich im Okular bei 17,5° C genau am Skalenteil 15,0 liegt, wenn die Mikrometerschraube Z auf Null steht. Ist dies nicht der Fall, so löst man an der Mikrometerschraube den äußeren Knopf durch Linksdrehung, wodurch die innere vernickelte geränderte Scheibe und die Skala gegeneinander frei beweglich werden. Die

innere Scheibe wird nun so lange gedreht bis die scharfe Schattenlinie wieder am Skalenteil 15,0 steht, der äußere Knopf wieder fest angezogen ohne etwas an der Einstellung zu ändern und danach die Justierung nochmals geprüft.

Da man im medizinischen Laboratorium meist nur wenig Substanz zur Verfügung hat, ist für diese Zwecke die Verwendung eines Hilfsprisma sehr wesentlich, weil hierdurch die Eiweißbestimmung mit einem Tropfen Serum oder Plasma möglich ist. Man setzt zu diesem Zweck den Metallbecher ohne Deckel auf die Fassung des Prismas auf und gibt auf das Hilfsprisma ( $P_2$ ) einen Tropfen Serum. Die beiden Prismen werden *fest* gegeneinander gepreßt, der Deckel D mit Bajonettverschluß aufgesetzt und das Instrument in den Temperiertrog gesetzt. Nach erfolgtem Temperaturengleich kann abgelesen werden, dabei ist das Instrument so zu halten, daß der vom Spiegel S reflektierte Lichtstrahl streifend auf die Berührungsfläche der Prismen fällt (Abb. 16) und der hellere Teil des Gesichtsfeldes maximal erhellt ist. Die Trennungslinie wird durch den Komparator R scharf eingestellt. Die Lage des Instrumentes ist nicht sehr wesentlich, da dadurch der abgelesene Wert nicht beeinflußt wird, da in jedem Falle die Lage der Schattenlinie auf der Skala von dem Grenzwinkel der totalen Reflexion bestimmt wird. Dagegen ist es wichtig auf das *Prismenpaar* (Nr. 1 bis 6), die *Temperatur* und die *Justierung* zu achten. Die Temperatur wird in dem Temperiertrog durch Zugabe von warmem oder kaltem Wasser auf 17,5° C gehalten und eventuelle Temperaturabweichungen nach der Korrekturtafel von B. WAGNER<sup>1</sup> ausgeglichen.

Die Messung ist in wenigen Minuten ausgeführt und erfordert nur sehr geringe Übung. Eine fraktionierte Bestimmung der Eiweißkörper ist auf diesem Wege nicht möglich.

**Prinzipien der Gasanalyse.** In einem Gasgemisch berechnen wir den anteilmäßigen Gehalt der einzelnen Gase, indem wir den Gehalt in Vol.-% angeben. Der Anteil in Vol.-% eines Gases ändert sich nicht, wenn der Druck sich ändert, auch nicht durch die Temperatur, sofern keine chemische Reaktion oder Adsorption stattfindet. Deshalb sind bei volumetrischen Gasanalysen (siehe II. Band) die Angaben von Druck und Temperatur unnötig. Zum Beispiel eine Expirationsluft behält stets ihre Zusammensetzung von etwa

$$\left. \begin{array}{l} 3,61\% \text{ CO}_2 \\ 17,05\% \text{ O}_2 \\ 79,37\% \text{ N}_2 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{bei, gleichgültig ob wir} \\ \text{bei } 37^\circ \text{ oder } 15^\circ, \end{array}$$

<sup>1</sup> Zu beziehen durch ZEISS, Jena.

bei einem Barometerdruck von 760 oder 700 mm Hg analysieren. Anders ist es wenn wir den *Partialdruck* eines Gases angeben wollen. Dann muß Druck und Temperatur in Rechnung gesetzt werden. Ein *reines* Gas, z. B. reine  $\text{CO}_2$  (100%ig) hat bei einem Barometerstand von 760 mm Hg einen Partialdruck von 1 Atm. bei 380 mm Hg Druck natürlich nur  $\frac{1}{2}$  Atm. Ebenso hat eine 50%ige  $\text{CO}_2$  bei einem Barometerstand von 760 mm nur einen Druck von  $\frac{760}{2}$  mm (50% von 760) = 380 mm. Oder eine 10%ige

$\text{CO}_2$ -Luftmischung hat einen Druck von  $\frac{760}{10} = 76$  mm Hg  $\text{CO}_2$ . Der

Rest des Gasdruckes wird von den anderen Gasmolekülen ausgeübt. Deshalb errechnet sich der Partialdruck P eines Gases aus dem %-Gehalt a multipliziert mit dem Barometerdruck b, und dividiert durch 100. Dies gilt für trockne Gase, für feuchte wasserdampfgesättigte Gase mit denen wir es fast immer zu tun haben, muß noch die Wasserdampfspannung d, deren Größe aus nachstehender Tabelle entnommen wird und die abhängig von der

Wasserdampfkorrektur für

t° C	Korrektur mm Hg	
11	-11,2	Nach ZECHMEISTER, Chem. Ztg. 1928, 52, 887 genügt es bei Temperaturen zwischen 11 und 21° C die Temperatur in mm vom Barometerdruck abzuziehen.
13	-12,9	
15	-14,7	
17	-16,7	
19	-18,9	
21	-21,4	

Temperatur ist, von dem gemessenen Barometerdruck abgezogen werden. Die Formel lautet demnach  $P = \frac{(b - d) \cdot a}{100}$

$$\begin{aligned} \text{z. B. gefunden } \text{CO}_2 &= 3,61\% \\ \text{O}_2 &= 17,05\% \\ t &= 20^\circ \text{C} \quad b = 758 \text{ mm.} \end{aligned}$$

$$P_{\text{CO}_2} = \frac{(758 - 20) \cdot 3,61}{100} = 26,65 \text{ mm Hg}$$

$$P_{\text{O}_2} = \frac{(758 - 20) \cdot 17,05}{100} = 126,0 \text{ mm Hg.}$$

Etwas anderes ist es, wenn man ein gefundenes Gasvolumen auf die sogenannten Normalbedingungen reduzieren will, d. h. auf die Bedingungen bei einem Druck von 760 mm und 0°C. Das gesuchte Volumen  $V_0$  ist dann in Abhängigkeit von dem gefundenen Volumen  $V$  und dem Druck und der absoluten Temperatur  $T$ . Diese ist gleich der Temperatur in °C + 273: Demnach

$$V_0 = \frac{v \cdot (b - d)}{760 (1 + \alpha T)}$$

$$\alpha = 0,00367.$$

Für obiges Beispiel würde sich bei einem gemessenen Volumen von

$$9,7 \text{ l ergeben } V_0 = \frac{9,7 \cdot (758 - 20)}{760 (1 + 0,00367 \cdot 293)} \text{ l}$$

$$V_0 = 8,775 \text{ l.}$$

Der Faktor, mit welchem das gefundene Volumen zu multiplizieren ist um  $V_0$  zu erhalten, ergibt sich aus nachstehender Tabelle. Für  $b$  ist darin immer der abgelesene Barometerdruck *abzüglich* der Wasserdampfspannung zu setzen.

Gasreduktionstabelle nach KNIPPING zur Reduktion auf 0° und 760 mm Hg. Die Wasserdampftension ist vom Barometerdruck abzuziehen.

mm Hg

Temperatur	700	705	710	715	720	725	730	735
16°	0,86996	0,87620	0,88238	0,88860	0,89482	0,90104	0,90726	0,91346
17°	696	318	0,87934	554	172	0,89792	412	032
18°	396	016	632	250	0,88866	482	102	0,90717
19°	102	0,86718	332	0,87946	562	176	0,89692	406
20°	0,85806	457	068	682	296	0,88908	522	134
21°	514	128	0,86736	348	0,87958	568	180	0,89790
22°	224	0,85834	442	050	660	268	0,88878	485
23°	0,84936	544	148	0,86756	364	0,87970	576	182
24°	648	256	0,85858	462	068	672	278	0,88882
25°	364	0,84968	570	172	0,86776	378	0,87982	582
26°	082	684	282	0,85884	484	084	686	286
27°	0,83802	402	0,84998	598	196	0,86794	394	0,87992
28°	522	120	715	312	0,85910	504	102	698
29°	246	0,83842	434	030	624	218	0,86814	468
30°	0,82970	564	155	0,84748	342	0,85933	526	118

Temperatur	740	745	750	755	760	765	770	775	780
16°	0,91968	0,92590	0,93212	0,93832	0,94454	0,95076	0,95796	0,96318	0,96940
17°	652	270	0,92890	508	128	0,94748	367	0,95986	605
18°	336	0,91952	570	186	0,93804	442	038	656	272
19°	022	636	252	0,92888	482	098	0,94712	328	0,95942
20°	0,90748	322	0,91937	548	162	0,93776	388	002	614
21°	402	012	624	234	0,92845	456	068	0,94678	288
22°	095	0,90702	312	0,91920	530	138	0,93748	356	0,94964
23°	0,89790	396	004	610	216	0,92824	430	037	644
24°	487	090	0,90696	300	0,91905	510	115	0,93720	324
25°	186	0,89788	392	0,90994	596	200	0,92802	405	007
26°	0,88888	487	088	688	290	0,91890	492	092	0,93692
27°	592	188	0,89788	386	0,90984	584	182	0,92782	380
28°	296	0,88892	490	084	682	278	0,91876	472	068
29°	104	598	192	0,89786	382	0,90976	572	166	0,92760
30°	0,87712	304	0,88898	490	082	676	268	0,91860	452

*Reinigen von Glassachen.* Abgesehen von besonderen Vorschriften, die für einzelne Methoden gegeben werden, werden Glassachen für 24—72 Stunden in eine Lösung aus 100 g Na-Bichromat, 100 ccm  $H_2SO_4$  conc., 1000 ccm  $H_2O$  (Leitungswasser) gelegt, danach abgewaschen, *gewässert*, mit destilliertem Wasser nachgespült und schließlich entweder an der Luft oder im Trockenschrank bei etwa 90° getrocknet. Das Trocknen mit Alkohol-Äther, was für Pipetten oft angewendet wird, ist nur bei Pipetten mit sehr kleinem Lumen 0,1—1,0 Stangenpipetten nötig. Man muß aber stets bedenken, daß Alkohol-Äther in der Regel kleine Mengen Fett enthalten.

Um Glasgefäße vollständig fettfrei zu machen werden sie am besten in einer Lösung von etwa 5% Na-Bichromat in 80%  $H_2SO_4$  auf etwa 120° 2 Stunden erwärmt, danach sehr reichlich mit Wasser gewaschen und getrocknet, auch alkoholische Kalilauge ist brauchbar.

Alle Gefäße in denen sich geronnenes Eiweiß befindet, werden in verdünnte Lauge gestellt, eventuell gelinde erwärmt, der Lösungsprozeß mit einem Holzstab oder dünnen weichen Kupferdraht mechanisch unterstützt. Nach dem Abspülen kann man mit alkoholischer HCl, und dann mit Äther nachspülen und an der Wasserstrahlpumpe trocknen.

*Fetten von Schliffen.* Für Schliffe gilt allgemein, daß sie vollkommen und gleichmäßig dünn mit Fett eingerieben werden. Werden die Schliffe fest ineinandergesetzt, so sollen sie klar sein, woran man das gute Fett und die Güte des Schliffs erkennt. Als

Fett wähle man nicht zu weiches, weil dies leicht die Hahnbohrungen verstopft, fast für alle Zwecke ist sogenanntes Ramsayfett zu gebrauchen, welches aus Vaseline mit einem kleinen Zusatz von Gummi besteht. Exsiccatorendeckel usw. werden mit reiner Vaseline eingefettet.

*Mikrobüretten.* Im klinischen Laboratorium, wo fast ausschließlich mit kleinsten Mengen gearbeitet wird, ist eines der wesentlichsten Handwerkzeuge die Mikrobürette:

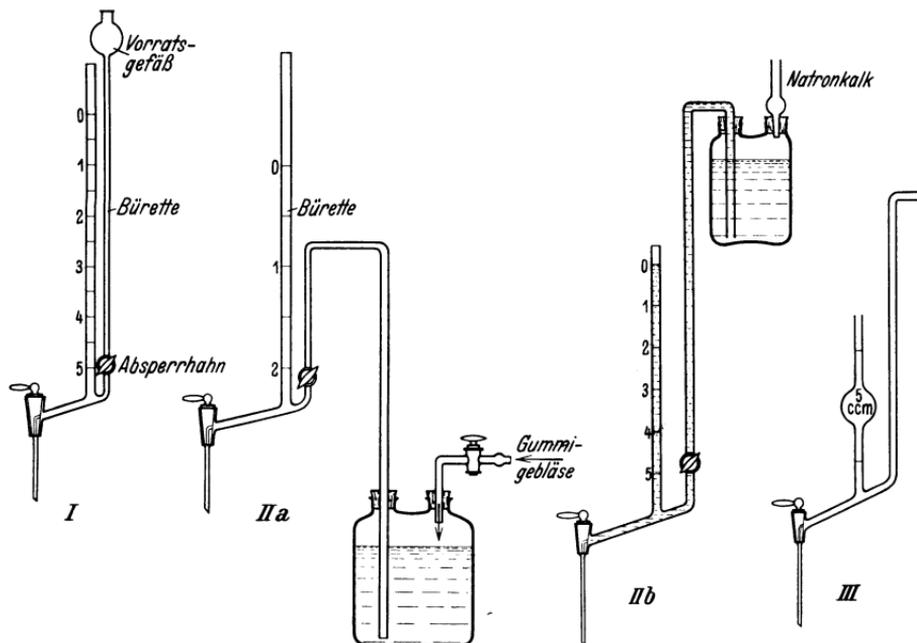


Abb. 18. Mikrobüretten verschiedener Form.

Man versteht darunter solche bis 10 ccm Fassungsvermögen und einer Einteilung von mindestens  $\frac{2}{100}$  cm<sup>3</sup>. Für vorübergehenden Gebrauch ist die Konstruktion I (Abb. 18) praktisch, für Lösungen die man immer wieder benötigt, die Konstruktion IIa und IIb. Bei IIa wird in der Woulfschen Flasche ein Überdruck durch einen Gummiballen erzeugt, während bei IIb die Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß durch den hydrostatischen Druck in die Bürette fließt, wenn der Hahn 2 geöffnet wird, nachdem die Rohre einmal gefüllt sind. Wird aus einer Bürette immer nur ein bekanntes Volumen abgezapft (z. B. 2 ccm), so ist es ratsam, eine Vollbürette nach III zu verwenden, da hier der Nachlauffehler bedeutend geringer ist, als bei den erst be-

schriebenen Konstruktionen. Unter Nachlauffehler versteht man jene Flüssigkeitsmenge, die von den Wänden noch abläuft, nachdem der Ablaufhahn schon geschlossen ist. Der Fehler ist prozentual desto größer, je kleiner das Lumen der Bürette ist, und verschwindet, wenn man die Flüssigkeit nur tropfenweise ausfließen läßt (30—50 Tropfen pro Minute).

Auch Makrobüretten (50 ccm) lassen sich zum wiederholten Abmessen derselben Flüssigkeitsmenge nach Abb. 18, IIa und IIb herstellen. Vor allem ist darauf zu achten, daß die Bürette fettfrei ist, weil sonst Tropfen an den Wandungen hängen bleiben und die auslaufende Menge ungenau wird. Die Hähne sind genügend zu fetten, damit sich das „Kücken“ ohne Reibung dreht.

Auf weitere Apparate des klinischen Laboratoriums braucht nicht eingegangen zu werden, ihre Anwendung wird als allgemein bekannt vorausgesetzt.

**Blutentnahme.** Mengen bis 0,2 ccm Blut können aus der Fingerbeere oder Ohrfläppchen entnommen werden, größere Mengen gewinnt man durch Venen- oder Arterienpunktion.

Wird aus der Fingerbeere Blut entnommen, so muß diese zuvor mit Äther gereinigt und wieder getrocknet werden. Der Einschnitt mit der Frankschen Nadel sei so tief, daß das Blut freiwillig austritt. Eventuell ist es ratsam vorher die Hand in warmes Wasser zu tauchen, oder die Ohren, besonders bei Tieren mit einer elektrischen Birne anzuwärmen bzw. durch Reiben mit Toluol eine Hyperämie zu erzeugen. Jedes Pressen und Quetschen, um Blut gewaltsam aus den Gefäßen heraus zu treiben, ist zu vermeiden.

Um Blut ungerinnbar zu machen, kann man eine *Spur* Hirudin oder Germanin, Novirudin, Liquoid 50 mg %, Na-Fluorid oder Na-Oxalat zusetzen. Von letzteren genügen 5—10 mg für 10 ccm Blut. In jedem Falle ist gut mit einem Glasstab, der am unteren Ende mit einem Stückchen Gummischlauch versehen ist, zu rühren. Am sichersten verhindert man die Blutgerinnung, wenn man eine mit der *Pipette* abgemessene Menge Blut in eine abgemessene Menge 3,8% Na-Citratlösung oder 2,8% Na-Oxalatlösung gibt. Zum Beispiel 4 ccm Blut zu 1 ccm 3,8% Na-Citrat, wobei die Verdünnung bei der Berechnung der analytischen Daten zu berücksichtigen ist.

Im übrigen ist bei der Behandlung von Blut besonders darauf zu achten, daß keine Veränderungen eintreten, die die beabsichtigte Analyse stören oder unmöglich machen; z. B. darf Blut, dessen CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Gehalt bestimmt werden soll, keinen Augenblick mit

der Luft in Berührung sein. Auch auf Sterilität ist gegebenenfalls zu achten. Für derartige Fälle sind bei den einzelnen Methoden Spezialvorschriften gegeben.

Auch die Bestandteile von Organteilen müssen vor ihrer Bestimmung vor Veränderungen geschützt sein, was nicht immer durch Gefrieren möglich ist.

Will man Blut hämolysieren, d. h. die Blutkörperchen zerstören, so bringt man es in Reagensgläser oder dergl., die man in eine Eis-Kochsalzmischung stellt, welche sich in einem Dewargefäß (Thermosflasche) befindet. Man wartet bis das Blut für längere Zeit vollkommen durchgefroren ist, taut auf, gefriert wieder und wiederholt dies mehrere Male, bis das Blut „lackfarben“ geworden ist. Die Stromata lassen sich dann abzentrifugieren. Auch durch Verdünnen mit der drei- bis fünffachen Menge destilliertem Wasser kann man Hämolysen erzielen, geringe Mengen Äther dem Blut zugesetzt, haben denselben Erfolg. Kommt Vollblut zur Analyse, so muß es entweder sofort verwendet werden, oder man muß durch sorgfältiges Rühren für eine gleichmäßige Wiederverteilung der Erythrocyten sorgen. *Kleine* Gerinnsel lassen sich durch mehrfache Lagen Mull abfiltrieren.

**Methoden zur Entfernung von Eiweiß.** Bei den meisten Untersuchungsmethoden wird das Eiweiß entfernt, wofür eine große Zahl von Methoden bekannt sind. Aber diese Methoden sind weder qualitativ noch quantitativ gleichwertig, da außer Eiweißkörpern auch noch andere Stoffe bei der Koagulation mitgerissen werden. So zeigt z. B. die folgende Tabelle, daß Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure außer dem Eiweiß auch noch Harnsäure, Xanthin, Aminosäuren und Kreatinin mitfällern. Dagegen bleiben jene Stoffe bei der Eiweißfällung mit Trichloroessigsäure oder Metaphosphorsäure in Lösung, und Wolframsäure fällt nur einen Teil der Aminosäuren. Es geht ohne weiteres aus diesem Beispiel hervor, daß die Wahl des Fällungsmittels äußerst wichtig, wie aus den angeführten Beispielen für die Bestimmung des Rest-Stickstoffes ersichtlich ist. Ein Teil der divergierenden Angaben über den Rest-N ist der Verwendung verschiedener Fällungsmittel zuzuschreiben. Aber auch auf störende Einflüsse auf beabsichtigte Reaktionen ist Rücksicht zu nehmen, wenn auch dieser Umstand weniger ins Gewicht fällt. Die Tabelle ist noch recht lückenhaft und soll nur in groben Zügen die Wichtigkeit des Fällungsmittels für die Eiweißkörper dartun. Es ist sehr zu wünschen, daß die Lücken ausgefüllt werden.



## Spezieller Teil.

### I. Anorganische Bestandteile.

**Bestimmung des Ca.** Das Calcium findet sich in geringer Menge in jeder Zelle oder biologischen Flüssigkeit, reichlich in Knochen, Zähnen und tierischen Gerüstsubstanzen. Pathologisch bei Arterienverkalkung, in verkalkten Tuberkelmassen, Harn-, Gallen- und Nierensteinen, regelmäßig in Faeces. Im Organismus ist es meist an  $\text{PO}_4'''$  oder  $\text{CO}_3''$  gebunden. Im Blut hat das ionisierte Calcium eine besondere Bedeutung für die Gerinnung und man kann deshalb Blut leicht ungerinnbar machen, wenn man die  $\text{Ca}''$  durch Oxalat-Ionen ausfällt oder durch Zusatz von Oxysäuren (Citronensäure) komplex bindet. Der Normalgehalt des Serums ist 9,5–10,5 mg-% Ca, die Erythrocyten sind calciumfrei. Plasma enthält weniger Calcium als Serum. Diesem *Gesamtwert* ist die meiste Beachtung geschenkt worden, weil die differenzierte Bestimmung in ionisiertes, dialysables und adsorbiertes Calcium methodisch außerordentlich schwierig ist. Der Normalwert ist sehr konstant. Eine Erniedrigung findet sich bei Vitamin D-Mangel, Tetanie, Rachitis und Nephritiden, wo Werte bis 6,1 mg-% gefunden wurden, bei gleichzeitigem Anstieg der anorganischen Phosphate. Erhöhte Werte finden sich bei der Recklinghausenschen Erkrankung (bis 19 mg-%), nach Injektion von Nebenschilddrüsenextrakten, bei Vitamin D-Hypervitaminose.

Die löslichen Ca-Salze können, wie schon gesagt, durch Oxalat-Ionen als schwerlösliches Ca-Oxalat  $\text{Ca}(\text{OOC})_2$  gefällt werden. Da Oxalsäure mit  $\text{KMnO}_4$  oder anderen  $\text{O}_2$  oxydationsmitteln titrimetrisch bestimmt werden kann, und andererseits im Calciumoxalat  $\text{Ca}(\text{OOC})_2$  die Menge Ca zur  $(\text{COOH})_2$  in einem bestimmten Verhältnis steht, läßt sich aus dem Verbrauch an  $\text{KMnO}_4$  die Menge Ca berechnen.

- Reagenzien: 1. Ammoniumoxalat 4%  
2. gesättigtes Na-Acetat  
3. Ammoniak 2 ccm  $\text{NH}_3$  (etwa 25%) ad 100 ccm  
4. Schwefelsäure 4,5% (etwa n)  
5.  $n/100$   $\text{KMnO}_4$   
6.  $n/100$  Na-Oxalat genau oder  $n/100$ -Oxalsäure.

*Ausführung.* Man pipettiert in ein spitzes Zentrifugenglas 2 ccm klares Serum (oder hämolysiertes und *zentrifugiertes* Blut), 2 ccm destilliertes Wasser, 1 ccm Lösung 1 und 2 ccm Lösung 2. Man mischt gründlich mit einem feinen Glasstab, spült diesen mit einigen Tropfen Wasser ab und läßt über Nacht stehen. Dann wird zentrifugiert bis die Flüssigkeit ganz klar (etwa 5 Minuten), vorsichtig abgegossen und mit der Öffnung nach unten auf ein Fließpapier gestellt, bis alle Flüssigkeit abgelaufen ist. Der Niederschlag in der Spitze des Zentrifugenglases wird mit einem feinen Glasstab aufgerührt und die Wände und Glasstab sorgfältig mit 3—4 ccm der verdünnten  $\text{NH}_3$ -Lösung (3) abgespült, wieder zentrifugiert und dies wird so lange wiederholt (4—5mal) bis sich im Waschwasser kein Ammoniumoxalat mehr nachweisen läßt. (Entfärbung von  $\text{KMnO}_4$   $n/100$  nach Zusatz von verdünntem  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und erwärmen.) Ist alles ausgewaschen, so löst man den Niederschlag in 2 ccm 4,5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Bildung von  $[\text{COOH}]_2$  und  $\text{CaSO}_4$ ), setzt für 1 Minute in ein siedendes Wasserbad (W.B.) und titriert mit  $n/100$   $\text{KMnO}_4$  bis eine eben sichtbare Rosafärbung 1 Minute bestehen bleibt. Die erste Entfärbung läßt etwas auf sich warten, wenn sich aber erst etwas  $\text{MnSO}_4$  (Manganosulfat) gebildet hat, tritt die Entfärbung prompt ein, solange noch Oxalsäure vorhanden ist. Man kann auch von vornherein einige Tropfen 1%- $\text{MnSO}_4$  zusetzen. Man multipliziert das Titrationsergebnis mit dem Titer der  $\text{KMnO}_4$ -Lösung, den man vor Benutzung mit der genau  $n/100$ -Na-Oxalatlösung oder Oxalsäure eingestellt hat (siehe S. 9).

*Beispiel.* 1 ccm  $n/100$   $\text{KMnO}_4$  ist äquivalent 0,2 mg Ca. Ca Atomgewicht 40,0; Äquivalentgewicht 20,0  $1/100$  Äquivalentgewicht = 0,200 g Ca in 1000  $\text{cm}^3$ . Verbrauch wurden: 0,963  $\text{KMnO}_4$ . Titer bestimmt: 1,06 (durch Titration gegen  $n/100$  Oxalsäure). Verbrauch berechnet:  $1,06 \cdot 0,963 = 1,021$   $n/100$ - $\text{KMnO}_4$ , entsprechend  $1,021 \cdot 0,2 = 0,2042$  mg Ca. Diese waren in 2 ccm Serum enthalten, mithin in 100 ccm  $0,2042 \cdot 50 = 10,2$  mg-%. Wichtig ist die vollständige Entfernung des überschüssigen Fällungsmittels, weil dieses relativ sehr konzentriert ist und schon Spuren das richtige Resultat entscheidend fälschen können. Deshalb Waschwasser prüfen!

**Der Magensaft.** Der Magen ist das einzige Organ, welches freie Salzsäure enthält um die Acidität des Magensaftes bis zum  $p_{\text{H}}$  1—2 zu bringen, der optimalen  $\text{H}^+$ -Konzentration für die Pepsinverdauung. Außer freier Salzsäure findet sich im Magen noch NaCl und ein Teil der freien Salzsäure wird vom Magen-



Demnach würde man angeben:

freie Salzsäure . . . . .	40
gesamte Salzsäure . . . . .	60
gesamte Säure . . . . .	65,0.

Oder wenn nach Zusatz der Indikatoren die Farbe orange ist, und tritt nach Zusatz von 1,34 ccm  $n/_{10}$  HCl zu 10 ccm Magensaft der Umschlag nach rot ein, so ist das Säuredefizit 13,4  $\text{cm}^3$  HCl für 100 ccm Magensaft. Die Methode ist nicht sehr genau und genügt im allgemeinen nur den klinischen Anforderungen.

**Gesamtchloride**, d. h. alle vorhandenen Chlor-Ionen kann man nach VOLHARD bestimmen. Die Methode ist brauchbar für den Harn, wo die Menge des ausgeschiedenen Chlors diagnostisch von Bedeutung ist, wie auch für Magensaft. Man muß zuvor das Eiweiß entfernen, fällt dann die Chloride mit  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$  und bestimmt titrimetrisch den Überschuß des  $\text{AgNO}_3$  mit  $n/_{10}$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  unter Verwendung von Ferriammonsulfat als Indikator. Ammoniumrhodanid gibt mit  $\text{Ag}'$  ebenfalls einen unlöslichen Niederschlag aber auch mit Ferrisalzen eine blutrote Färbung (Ferrirhodanid in großer Verdünnung gelb-rot). Deshalb tritt bei der Titration mit  $n/_{10}$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  in dem Augenblick eine bleibende Rotfärbung ein, wo keine  $\text{Ag}'$  mehr vorhanden sind und sich das stark gefärbte aber lösliche Salz  $\text{Fe}(\text{CNS})_3$  bildet. Bei Gegenwart von  $\text{AgCl}$  verschwindet die Farbe nach kurzer Zeit. Wären keine Chloride vorhanden, die mit  $\text{AgNO}_3$  reagieren könnten, so würde man eben so viel  $n/_{10}$ -Ammoniumrhodanid zurücktitrieren, wie  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$  zugesetzt worden ist. Da aber  $\text{Ag}'$  als unlösliches  $\text{AgCl}$  entfernt wurden, wird man weniger  $n/_{10}$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  brauchen und kann aus der Differenz die Menge des verschwundenen  $\text{Ag}'$  bzw.  $\text{Cl}^-$  berechnen.

*Reagenzien.* 10% Na Wolframat.  $n/_{10}$ -Silbernitrat.  $n/_{10}$ -Ammoniumrhodanid (etwa 8 g ad 1000), dessen Titer gegen die Silberlösung eingestellt wird. 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; Salpetersäure 25–30%. Ferriammonsulfat pulverisiert.

*Ausführung.* Magensaft oder eiweißhaltiger Harn werden zuerst enteiweißt, indem man 10–15 ccm in einen Meßkolben pipettiert mit je 5 ccm Na-Wolframat und 3% Schwefelsäure versetzt und auf 25 ccm auffüllt und filtriert.

Vom Filtrat kommen 20 ccm (oder ein anderer gemessener Teil) in einen 50 ccm-Meßkolben, dazu etwa 3 ccm  $\text{HNO}_3$  und eine genau abgemessene Menge (20–30 ccm)  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$ . Eine bestimmte Menge läßt sich nicht angeben, da die Konzentrationen der  $\text{Cl}^-$  im Harn in weiten Grenzen schwanken (0,1–1,2% NaCl),

es muß aber ein Überschuß vorhanden sein, d. h. man muß mindestens 2 ccm  $n/_{10}$ -Ammoniumrhodanid zurückeritrieren. Es wird auf 50 ccm aufgefüllt, nach dem Absitzen des Niederschlages durch ein trockenes Filter filtriert und vom Filtrat 25 ccm mit einer kleinen Messerspitze Ferriammonsulfat versetzt und darauf mit  $n/_{10}$ -Rhodanlösung titriert bis eine schwache Rotfärbung *bestehen bleibt*. Eine Rotfärbung zeigt sich beim Einfallen jeden Tropfens, verschwindet aber beim Umschütteln solange noch  $\text{AgCNS}$  ausfällt. Den Titer der  $n/_{10}$ - $\text{NH}_4\text{CNS}$ -Lösung bestimmt man durch Titration gegen 10 ccm  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$ , indem man unter Zusatz vom Ferriammonsulfat und  $\text{HNO}_3$  wie oben die bis zum Farbumschlag nötige Menge Ammoniumrhodanid bestimmt.

*Berechnung.* Je mehr  $\text{Ag}^+$  von  $\text{Cl}^-$  gefällt wurden, desto weniger sind noch vorhanden nach der Filtration um mit  $\text{NH}_4\text{CNS}$  gefällt zu werden.

1 ccm  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$  entspricht 1 ccm  $n/_{10}$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  und wenn 20 ccm  $\text{AgNO}_3$  vorgelegt werden und man braucht, nach der Korrektur durch den Titer, noch 7,62 ccm  $n/_{10}$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  um das überschüssige Silber zu fällen, so sind 12,38 ccm  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3$  zur Fällung des Chlors verbraucht worden. 1 ccm  $n/_{10}$   $\text{AgNO}_3 = 3,54$  mg Chlor oder 5,85 mg NaCl, demnach wären 12,38 · 5,85 mg = 72,4 mg NaCl vorhanden gewesen, die bei Harn auf die gesamte Harnmenge umzurechnen sind. Hat man 10 ccm Harn von der Gesamtmenge von 840 ccm verwendet, so ergibt sich folgende Rechnung. Die 10 ccm wurden aufgefüllt ad 25, davon nahmen wir 20 ccm die auf 50 ccm gebracht wurden und titrierten davon 25 ccm. Diese entsprachen somit  $\frac{10 \cdot 20 \cdot 25}{25 \cdot 50}$  ccm Harn = 4 ccm

Harn mit 72,4 mg, mithin Tagesausscheidung  $\frac{72,4 \cdot 840}{4}$  mg NaCl = 15,12 g.

Wichtig ist, daß man sich von der richtigen Einstellung der Silberlösung überzeugt hat. Bei normaler Kost werden 11–15 g NaCl pro Tag ausgeschieden.

*Chloride im Blut nach RUSZNIAK.* Die Kenntnis der Cl-Konzentration im Blut oder Serum ist von mehrfacher klinischer Bedeutung (Erbrechen, Pneumonie, Nierenerkrankungen, Ödemen und hyperphysären Erkrankungen). Der normale Gehalt an Kochsalz ist: 0,45–0,50% im Vollblut und 0,56–0,62% im Serum. Der gesamte Bestand des Körpers ist ungefähr 150 g NaCl. Die höchsten Konzentrationen findet man im Blut, Haut und Niere. Im Körper dienen die Chloride dazu den osmotischen Druck auf-

recht zu erhalten, sie schwanken infolgedessen nur in geringen Grenzen, dagegen kommen im Harn Schwankungen von 0,1 bis 1,2 g-% vor. Außer im Harn wird Cl auch durch den Schweiß und Tränen ausgeschieden.

*Prinzip.* Zur Bestimmung müssen die Eiweißkörper entfernt werden, um Silberverlusten vorzubeugen. In kleinen Mengen werden die Proteine und auch Purine leicht in der Hitze mit  $\text{KMnO}_4$  in  $\text{HNO}_3$  verbrannt, wobei keine Cl-Verluste auftreten, wenn das  $\text{Cl}^-$  an  $\text{Ag}^+$  gebunden ist. Der Überschuß an  $\text{KMnO}_4$  und gebildetem Braunstein wird mit Dextrose zerstört (Reduktion zu farblosem Manganosalz) und dann der Überschuß an Silber mit Rhodanammonium bestimmt.

*Reagenzien.*  $n/100$   $\text{AgNO}_3$ ,  $n/100$   $\text{NH}_4\text{CNS}$ ,  $\text{HNO}_3$  spezifisches Gewicht 1,4 (= 60%) chlorfrei! 10%  $\text{KMnO}_4$  chlorfrei!

Dextrose chlorfrei! (Eine Dextroselösung darf auf Zusatz von  $\text{HNO}_3$  und  $\text{AgNO}_3$  keine Trübung zeigen!)

Ferriammonsulfatpulver.

*Ausführung.* Man bestimmt zuerst den Titer der Rhodanlösung indem man 2 ccm  $n/100$   $\text{AgNO}_3$  mit wenig  $\text{HNO}_3$  und einer Spur Ferriammonsulfat versetzt und mit  $n/100$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  titriert. (Mikrobüretten.) Dann gibt man in einen Erlenmeyerkolben von 50 ccm etwa 3 ccm destilliertes Wasser und pipettiert mit einer sogenannten Blutzuckerpipette 0,1 ccm Blut hinein, indem man das Wasser vorsichtig mehrmals in der Pipette hochsaugt. Die von R. angegebene Spezialapparatur ist entbehrlich. (Biochem. Z. 1921, 114, 25.) Dann gibt man sehr genau 2 ccm  $n/100$   $\text{AgNO}_3$  dazu und zehn Tropfen  $\text{HNO}_3$ , erhitzt auf einem Asbestdrahtnetz zum gelinden Sieden, während man aus einer Pipette oder Tropfglas  $\text{KMnO}_4$ -Lösung tropfenweise zugibt. Man kann bequem bis vier Kolben zu gleicher Zeit oxydieren. Es bildet sich meist etwas Braunstein. Die Oxydation ist beendet wenn die rote  $\text{KMnO}_4$ -Farbe kurze Zeit erhalten bleibt. Man entfärbt noch heiß mit Dextrose ohne weiter zu kochen und läßt erkalten. Das Chlorsilber bildet einen dicken weißen bis bräunlichen Niederschlag und die Flüssigkeit ist klar.

Man gibt jetzt eine Spur Ferriammonsulfat dazu und titriert mit  $n/100$   $\text{NH}_4\text{CNS}$  bis zum Umschlag in gelb-rot.

*Berechnung.* Wenn 0,1 ccm Blut zur Analyse gelangen, 2 ccm  $n/100$   $\text{AgNO}_3$  vorgelegt und 0,95 ccm  $\text{NH}_4\text{CNS}$  zurücktitriert wurden, sind:  $[2 - (0,95 \cdot \text{Titer})] \cdot 585$  mg-% NaCl vorhanden. 1 ccm  $n/100$   $\text{AgNO}_3 = 0,585$  mg NaCl. Die Methode ist auch auf den Harn anwendbar.

Bequemer als die vorstehend beschriebene Methode ist folgende<sup>1</sup>:

*Prinzip.* Merkurinitrat gibt mit Nitroprussidnatrium in saurer Lösung einen Niederschlag, nicht aber in Gegenwart von NaCl, da sich aus  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  und NaCl das nicht dissoziierte  $\text{HgCl}_2$  bildet, welches diese Eigenschaft nicht hat. Deshalb tritt eine Trübung erst auf, wenn überschüssiges  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  vorhanden ist. Man hat bei der Methode einen Leerwert zu bestimmen, der teils aus Spuren von NaCl in den Reagenzien stammen kann, teils daher, daß die allererste Trübung von  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  mit Nitroprussidnatrium nicht zu erkennen ist.

*Reagenzien.* Frische Nitroprussidlösung 5%.

2.  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{ aq.}$  KAHLBAUM. 3,09 g ad 1000 unter Zusatz von  $\text{HNO}_3$  bis zur klaren Lösung oder man löst 1,853 g rotes Quecksilberoxyd in einem kleinen Überschuß von konzentrierter  $\text{HNO}_3$  und verdünnt ad 1000 ccm. Der Titer wird gegen eine  $n/100$  NaCl-Lösung bestimmt und in Milligramm NaCl pro Kubikzentimeter ausgedrückt.  $n/100$  NaCl = 0,5846 reinstes bei 120° getrocknetes NaCl ad 1000 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Lösung wird mit einem Tropfen Toluol versetzt. 3. 10% Na-Wolframat. 4. 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

*Ausführung.* Man enteiweißt 2,0 ccm Blut nach Folin Wu, indem man sie im Meßkolben mit etwa 10 ccm Wasser hämalysiert, dann je 2 ccm Na-Wolframat und 3% Schwefelsäure zusetzt, nimmt 5 ccm Filtrat, gibt abgemessen drei Tropfen Nitroprussidnatriumlösung dazu und versetzt aus einer Mikrobürette mit der Merkurinitratlösung. Die Titration ist beendet, sobald eine Trübung sichtbar wird, die am besten vor einem *schwarzen Hintergrund* und *seitlicher* Beleuchtung erkannt wird. Man bestimmt einen Leerwert, indem man 5 ccm der entsprechend verdünnten Fällungsmittel ebenso behandelt und den Verbrauch an  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  bis zur sichtbaren Trübung in Abzug bringt.

Entnimmt man das Blut aus der Fingerbeere oder dem Ohr-läppchen, so verfährt man in folgender Weise: in ein kleines Zentrifugenglas gibt man 1,8 ccm einer Mischung von: 1 Teil Na-Wolframat, 1 Teil 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 7 Teilen Wasser (wenig haltbar), pipettiert dazu 0,2 ccm Blut, indem man die Flüssigkeit mehrmals hin und her saugt, mischt gut, zentrifugiert und pipettiert sich von der klaren Flüssigkeit 1,0 oder 1,5 ccm in ein Kölbchen und titriert wie oben.

<sup>1</sup> GEYER u. ROTSCH, Z. Unters. Lebensmitt. 1933, 65, 66.

*Berechnung.* 1 ccm der  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung entsprechen zum Beispiel 1,00 mg NaCl (laut Bestimmung); es wurden titriert für 5 ccm Filtrat:

	3,27 und 3,23 ccm $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
Mittel	3,25 ccm
Leerwert	0,05 ccm
	<u>3,20 ccm</u> = 3,20 mg NaCl.

Diese 3,20 mg stammen aus 0,5 ccm Blut und es ergibt sich eine Konzentration von 640 mg-% NaCl.

II. Beispiel: Für 1,5 ccm Blutfiltrat verbraucht

im Mittel	1,05 ccm $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
Leerwert	0,03 ccm $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
	<u>1,02 ccm</u> = 1,02 mg NaCl

aus 0,15 ccm Blut = 679 mg-% NaCl.

Die Methode eignet sich auch ausgezeichnet für Harn. Man kann, wenn nötig, entweißen oder nativen filtrierten Harn verwenden. Stark gefärbte Harnen schüttelt man mit Tierkohle (etwa 1 g auf 20 ccm Harn) nach LARSON und verwendet das meist wasserklare Filtrat, von dem eine bestimmte Menge, die von der Konzentration des Harnes abhängt, gemessen wird. Man kann ebenso gut bei konzentrierten Harnen zur Titration eine starke Lösung von  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  verwenden.

Für den Harn und Blut ist die Methode sicher derjenigen von RUSZNIAK an Einfachheit überlegen. Man verwende nur frisch bereitete Lösungen von Nitroprussidnatrium und gewöhne sich daran stets die gleiche Menge Indikator zuzusetzen.

**Ammoniak im Harn.** Das vermehrte Ammoniak im Harn, gebunden an Säuren, ist ein wichtiges Kriterium für eine Acidosis, da sich der Körper der *anormal* gebildeten organischen Säuren ( $\beta$ -Oxybuttersäure und Acetessigsäure aus dem pathologischen Fettsäureabbau) durch Neutralisation mit Ammoniak zu entledigen sucht; auch ein Teil der fixen Alkalien des Blutes wird von den pathologisch vermehrt gebildeten Säuren beschlagnahmt und eine Verminderung des  $\text{CO}_2$ -Gehaltes des Blutes ist die natürliche Folge; werden aber die Fettsäuren normal zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  verbrannt, so verläßt erstere als flüchtige Säure den Organismus durch die Lungen, ohne Alkalien oder  $\text{NH}_3$  zur Neutralisation zu gebrauchen. Neben der schädlichen Wirkung als Säure haben die sogenannten Ketonkörper auch noch eine spezifische toxische Wirkung.

Im Gegensatz zur vermehrten  $\text{NH}_3$ -Ausscheidung beim Diabetes mellitus, findet sich eine verminderte  $\text{NH}_3$ -Ausscheidung

bei Nierenleiden und da in beiden Fällen die Veränderungen im Blut (verminderte Alkalireserve und Kohlensäurespannung) die gleichen sind, ist es wichtig in allen Fällen die  $\text{NH}_3$ -Bestimmung im Harn mit heranzuziehen. Um zuverlässige Werte zu erhalten ist einer bakteriellen Zersetzung vorzubeugen.

Die normale Ammoniakausscheidung beträgt etwa 0,7 g  $\text{N}_2 = 5\%$  des gesamten Stickstoffs des Harns. Im Blut schwanken die Werte nach oben und unten je nach der Ernährung. Pathologisch kann es um das Vielfache vermehrt sein und vor allem wesentlich mehr als 5% der gesamten Stickstoffausscheidung ausmachen. Will man das Ammoniak bestimmen, so sind die Versuchsbedingungen so zu wählen, daß aus den anderen N-haltigen Stoffen des Harns (zum Beispiel Harnstoff) kein Ammoniak freigemacht wird. Deshalb darf man nicht mit NaOH alkalisieren, sondern vorteilhaft mit einem Gemisch basischer Salze, deren Alkalität ausreicht, um das  $\text{NH}_3$  in Freiheit zu setzen, ohne zum Beispiel Harnstoff zu zersetzen. Hierzu gebraucht man gesättigte Sodalösung, Na-Borat, Calcium- oder Bariumhydroxyd, sofern der Harn eiweißfrei ist oder das Eiweiß entfernt wurde.

*Reagenzien.*

1.  $n/20 \text{ H}_2\text{SO}_4$ .
2.  $n/20 \text{ KOH}$  oder  $\text{NaOH}$  (eventuell Titer zu bestimmen).
3. Indikator Neutralrot 0,01 g  
Methylenblau Spur } ad 100 ccm Wasser.

Der Indikator gibt einen gut sichtbaren Umschlag von violett in grün (vgl. auch Seite 16).

4.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  in Methylalkohol, gesättigt mit 0,1% Oktylalkohol.

*Apparatur.* Vakuumapparatur nach S. 69, Abb. 24. Das Wasserbad ist auf  $40^\circ/15^\circ$  temperiert. In Teil A kommen 1 ccm saurer Harn, oder je nach  $\text{NH}_3$ -Gehalt mehr oder weniger, in Teil A<sub>2</sub> 2,0 ccm der  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung in Methylalkohol und in Teil B genauestens 2,00 ccm  $n/20 \text{ H}_2\text{SO}_4$ . Der Apparat wird verschlossen, evakuiert (20 mm) und in da Wasserbad gestellt (Teil A  $40^\circ$ ), nachdem die Anteile von A vorsichtig gemischt sind. Nach 20 Minuten ist die Destillation beendet und der Säureüberschuß wird durch  $n/20 \text{ NaOH}$  aus einer Mikrobürette titrimetrisch bestimmt, nachdem zwei Tropfen Indikator zugesetzt waren. Die Säure kann direkt titriert werden, da bei dem geringen Volumen der Farbumschlag gut zu erkennen ist. Die jodometrische Bestimmung ist auch gangbar.

Ein Blindwert, der an Stelle des Harns Wasser enthält, ist zu bestimmen und der Verbrauch an Säure vom Hauptversuch abzuziehen.

Um zu kontrollieren, ob der Harn auch genügend alkalisiert worden ist, empfiehlt sich der Zusatz eines Tropfens Phenolphthalëin.

*Berechnung:* 1 ccm  $n_{20}$   $H_2SO_4 = 0,7$  mg  $N_2$  als  $NH_3$ . Zum Beispiel

vorgelegt . . . . .	2,00	$n_{20}$ -Säure	
verbraucht $n_{20}$ NaOH im Haupt-			
versuch 1 . . . . .	1,146	ccm	
verbraucht Leerversuch . . . . .	0,032	ccm	1,178
verbraucht vom $NH_3$ . . . . .			0,822
in 1 ccm Harn $0,822 \cdot 0,7$ mg $N_2 =$			0,5754

Harnmenge 1280 ccm.

$$\begin{aligned} \text{Tagesausscheidung} &= 1280 \cdot 0,5754 \text{ mg} \\ &= 737 \text{ mg} = 0,737 \text{ g.} \end{aligned}$$

Die im *Blut* vorkommenden Ammoniakmengen schwanken zwischen 0,05 bis 0,1 mg-%. Wegen der geringen Mengen ist die einwandfreie Bestimmung schwierig und auf eine Darstellung der Methodik wird an dieser Stelle verzichtet; zumal die Blutwerte nur ein geringes klinisches Interesse besitzen.

*Alkalireserve.* Wie schon eben erwähnt, steht die pathologische  $NH_3$ -Ausscheidung in direktem Zusammenhang mit der Alkalireserve; da durch die sogenannten fixen (nicht flüchtigen) Säuren das Alkali des Blutes beschlagnahmt ist, wird vom Organismus, um das  $p_H$ -Optimum des Blutes nach Möglichkeit aufrecht zu erhalten, vermehrt  $CO_2$  durch die Lungen ausgeschieden. Dadurch wird der Bicarbonatgehalt des Blutes vermindert, die Pufferfähigkeit herabgesetzt und *allmählich* auch die  $H^+$  vergrößert ( $p_H$  verkleinert). Man spricht dann von dekompensierten Acidosen im Gegensatz zur kompensierten, wenn die aktuelle  $H^+$ -Ionenkonzentration des Blutes noch erhalten ist, aber die Alkalireserve schon vermindert. Eine vermehrte Alkalireserve findet man bei einer Behinderung des Gasaustausches in den Lungen, ferner durch alkalische Medikamente und Kost. Häufiger ist die Verminderung der Alkalireserve, die bei allen Krankheiten mit vermehrter Säurebildung oder Retention einhergeht, Diabetes und Niereninsuffizienz, im Hunger bei gleichzeitiger Ketonurie, bei Schwangerschaftstoxikosen und Säurevergiftung. Die Alkalireserve des Blutes wird ausgedrückt in Vol.-%  $CO_2$ , die das Plasma bei einer Spannung von 40 mm  $CO_2$  zu binden vermag. Um dies zu erreichen, muß das Plasma mit  $CO_2$  von 40 mm Spannung (etwa 5,5% bei 760 mm Druck) gesättigt werden.

Die ganze Bestimmung gliedert sich in drei Teile:

1. Vorbereitung der Apparatur und Reagenzien.
2. Entnahme des Blutes und Sättigung des Plasmas.
3. Bestimmung und Berechnung der Alkalireserve.

*Apparatur.* Die Apparatur ist von VAN SLYKE konstruiert und in nebenstehender Abb. angegeben (Abb. 19). Das Niveau-

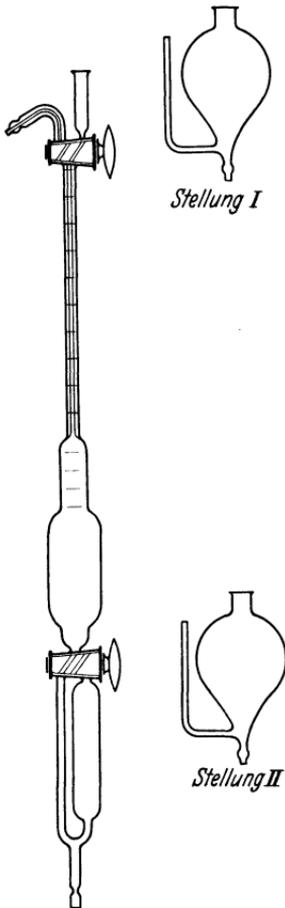


Abb. 19.  
Apparat nach VAN SLYKE zur  
volumetrischen Bestimmung  
der Alkalireserve.

gefäß ist mit dem Apparat durch einen dicken Vakuumschlauch verbunden. Der Schlauch wird praktischer Weise vor Gebrauch mit Vaseline *im Vakuum* erwärmt, um zu verhindern, daß er später Sulfide an das Quecksilber abgibt. Das Niveau-

gefäß trägt einen seitlichen Ansatz, um die Ablesung bei Niveaugleichheit zu erleichtern. Der Apparat selbst ist mit Quecksilber gefüllt und wird auf einem handfesten Brett mit entsprechend geformten Klötzen und Bändern befestigt und während des Versuchs entweder mit der Hand oder einem Elektromotor geschüttelt. Die Plasma-  
probe wird durch den Ansatz mit Hilfe einer Ostwaldschen Pipette eingefüllt (Abb. 20). Damit die Pipette dicht anschließt und das Plasma sofort in die Kammer, läuft wird die Spitze mit einem 1 cm langen Stückchen

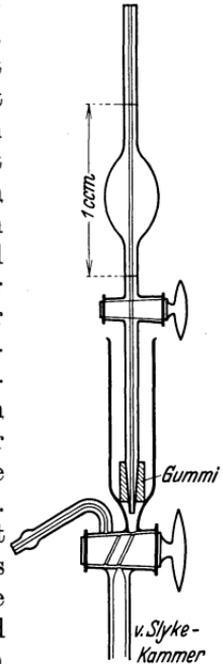


Abb. 20. Ostwald-  
pipette auf der  
VAN SLYKE-Kammer.

Die Kammer selbst ist im oberen Teil feinst graduiert bis zu 2,5 cm und trägt weiter eine Marke bei 50 cm. Im unbenutzten Zustand soll er ständig bis in den Ansatz mit Wasser gefüllt sein. Nach jeder Analyse und vor Gebrauch wird er mit etwa 0,9% Milch-

säure gereinigt, indem man den Apparat von unten mit Quecksilber füllt, bei geschlossenem Hahn das Niveaugefäß in Lage 2 bringt, in den Ansatz Milchsäure bringt und dann durch den Hahn mit etwas Luft einströmen läßt. Es wird heftig geschüttelt, die verbrauchte Milchsäure durch den gebogenen Ansatz entfernt und bis zur Säurefreiheit mit destilliertem, dann  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser nachgewaschen. Wird der Apparat evakuiert, indem man das Niveaugefäß etwa 80 ccm unterhalb des Hahnes senkt, so soll sich oberhalb des Hahnes ein Tropfen Quecksilber befinden und wenn das Quecksilber schnell steigt mit metallischem Klang an den Hahn anschlagen, zum Zeichen dafür, daß keine Luft durch die Hähne angesaugt ist. Anderenfalls sind die Hähne zu reinigen, trocknen und frisch zu schmieren (Ramsay-Fett).



Abb. 21.

*Reagenzien.* 1. Etwa 0,9% Milchsäure aus konzentrierter Milchsäure (etwa 90% spezifisches Gewicht 1,2) 10mal verdünnen. Die Milchsäure wird in kleinen Portionen längere Zeit evakuiert und unter  $\text{CO}_2$ -Abschluß aufgehoben, indem man sie in ein Chlorcalciumrohr der nebenstehenden Form bringt (Abb. 21). Dieser Abschluß ist sauberer als mit Paraffinöl. Der Milchsäure wird auf je 100 ccm 1–2 Tropfen Oktylalkohol zugesetzt.

2. Ammoniaklösung: 4 ccm konzentriertes Ammoniak (25%) werden mit etwas Methylorange versetzt und auf 100 ccm aufgefüllt. Diese Lösung wird mit etwas gepulvertem  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  geschüttelt, filtriert und das gelöste  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  durch ein paar Tropfen konzentriertes Ammoniumsulfat gefällt und nach dem Absitzen entweder filtriert oder abgossen.

3. 10%ige Schwefelsäure.

*Blutentnahme.* In ein Zentrifugenglas gibt man einige Milligramme Na-Oxalat und neutrales Na-Fluorid, überschichtet mit Paraffinum liquidum. Das Blut wird mit trockener, eventuell paraffinierter Spritze entnommen und unter das Paraffin langsam ausgespritzt, danach mit einem Glasstab gleichmäßig und anhaltend gerührt und scharf abzentrifugiert. Man entnimmt etwa 3 ccm Plasma, füllt sie in einen 300 ccm fassenden Scheidetrichter mit kurzem Rohr, den man aus einer Bombe oder Gasometer mit Luft-Kohlensäure 5,5% füllt. Dabei wird der Scheidetrichter langsam gedreht. Es ist auch möglich, den Scheidetrichter mit Alveolarluft zu füllen, indem man die letzten Reste einer normalen Expiration hindurchstreichen läßt. Der Wasserdampf der Lungen-

luft wird durch eine mit Glasperlen angefüllte Pulverflasche von etwa 50 g Inhalt zurückgehalten. Die Schlauch- und Glasverbindungen müssen genügend weit gehalten werden. Das horizontale Drehen des Scheidetrichters wird mit geschlossenem Hahn und Stopfen bei Zimmertemperatur einige Minuten fortgesetzt, bis Plasma und Gas im Gleichgewicht sind, dann läßt man das Plasma durch den Hahn *unter* Paraffin laufen und entnimmt die Analysenproben mit der Ostwaldschen Pipette, die außen sorgfältig abgetrocknet wird.

*Analyse.* Der Apparat ist vollkommen mit Hg gefüllt, das Niveaugefäß ist in Lage 2, im Trichter befinden sich einige Tropfen  $\text{NH}_3$ -Lösung, der obere Hahn ist geschlossen, der untere Hahn offen. Die gefüllte Ostwaldpipette wird mit dem Gummischlauch angepreßt und ihr Hahn geöffnet. Durch das fallende Hg wird jetzt beim Öffnen des oberen Hahnes der Inhalt der Pipette eingesogen bis zur Marke, beide Hähne geschlossen. In den Trichter kommen etwa 1,5 ccm Milchsäure, die bis zur Marke 2,5 in die Kammer eingesogen werden, der obere Hahn wird geschlossen; darauf durch einen Tropfen Hg gedichtet und die Kammer evakuiert, indem durch Senken des Niveaugefäßes das Hg bis zur Marke 50 ccm abfließt. Jetzt wird 15–20mal heftig geschüttelt und die Flüssigkeit bis auf einen kleinen Rest nach dem untersten Teil gesaugt, ohne daß ein Teil des Gases mitgerissen wird. Durch den linken Schenkel steigt das Quecksilber in die Höhe, bis es in der Kammer und dem Niveaugefäß gleich hoch steht. Das Volumen wird abgelesen und aus den folgenden Tabellen die Alkalireserve berechnet unter Berücksichtigung von Druck und Temperatur. Zuerst muß das Volumen auf 760 mm reduziert werden, ohne Rücksicht auf die Temperatur; dies geschieht durch Multiplikation des abgelesenen Volumens mit dem Faktor der Tabelle I. Da nun weiter durch die Milchsäure sowohl physikalisch gelöste wie chemisch als Bicarbonat gebundene Kohlensäure ausgetrieben wurde, bedarf es einer zweiten Korrektur durch Tabelle II, aus welcher, bei Anwendung von 1 ccm Plasma, sofort die Alkalireserve in Vol.-%  $\text{CO}_2$  für Bicarbonat-Kohlensäure abgelesen werden kann. Bei dieser Tabelle ist für die Temperaturen eventuell zu interpolieren.

*Beispiel.* Abgelesen: 0,60 ccm  $\text{CO}_2$  Bar. 755 mm Hg. Temp.  $19^\circ \text{C}$ . Reduktionsfaktor I =  $0,9935 \cdot 0,60 = 0,596$ . Alkalireserve aus Tabelle II ergibt für

0,60 ccm bei $20^\circ$	48,1	}	0,596 bei $20^\circ$	47,7
0,59 ccm bei $20^\circ$	47,1		—	0,06

Alkalireserve =  $\frac{47,7}{0,06} = 47,64$  Vol.-%  $\text{CO}_2$

für 1<sup>0</sup> Temperaturdifferenz erniedrigt sich der Wert um 0,06 Vol.-%. Es ist dringend zu empfehlen Ostwaldsche Pipetten zu benutzen. Stehen diese nicht zur Verfügung, so unterschichtet man die 1,0 ccm Plasma in dem Trichter unter etwas Ammoniak und saugt alsdann ein. Das übrige bleibt dasselbe. Kommen nur 0,5 ccm Plasma zur Analyse, so wird Milchsäure nur bis zur Marke 1,25 zugesetzt und die Werte der Tabelle II verdoppelt. Es ist in *jedem Falle* ratsam, Doppelanalysen zu machen. Unter normalen Verhältnissen liegt der Wert der Alkalireserve des Plasmas zwischen 77 und 53 Vol.-% CO<sub>2</sub>; mäßige Acidose ergibt Werte zwischen 40 und 30, Komawerte unter 20.

Tabelle I. Reduktion des Gasvolumens ohne Temperaturberücksichtigung auf 760 mm Hg

Barometer	Faktor	Barometer	Faktor
732	0,963	756	0,995
34	66	58	97
36	68	60	1,000
38	71	62	03
40	74	64	06
42	76	66	08
44	79	68	11
46	81	70	13
48	84	72	16
50	87	74	18
52	89	76	21
54	92	78	24

Tabelle II. Alkalireserve in Volumen % CO<sub>2</sub> bei Anwendung von 1 ccm Plasma.

Reduziertes Gasvolumen nach Tabelle I	Alkalireserve in Volumen % CO <sub>2</sub> nach Abzug der gelösten CO <sub>2</sub>				Reduziertes Gasvolumen nach Tabelle I	Alkalireserven in Volumen % CO <sub>2</sub> nach Abzug der gelösten CO <sub>2</sub>			
	15 <sup>0</sup>	20 <sup>0</sup>	25 <sup>0</sup>	30 <sup>0</sup>		15 <sup>0</sup>	20 <sup>0</sup>	25 <sup>0</sup>	30 <sup>0</sup>
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,30	18,8	19,5	20,2	20,8
1	10,1	10,9	11,7	12,6	1	19,7	20,4	21,1	21,7
2	11,0	11,8	12,6	13,5	2	20,7	21,4	22,1	22,6
3	12,0	12,8	13,6	14,3	3	21,7	22,3	23,0	23,5
4	13,0	13,7	14,5	15,2	4	22,6	23,3	24,0	24,5
5	13,9	14,7	15,5	16,1	5	23,6	24,2	24,9	25,4
6	14,9	15,7	16,4	17,0	6	24,6	25,2	25,8	26,3
7	15,9	16,6	17,4	18,0	7	25,5	26,2	26,8	27,3
8	16,8	17,6	18,3	18,9	8	26,5	27,1	27,7	28,2
9	17,8	18,5	19,2	19,8	9	27,5	28,1	28,7	29,1
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,40	28,4	29,0	29,6	30,0

## Fortsetzung von Tabelle II.

Reduziertes Gasvolumen nach Tabelle I	Alkalireserve in Volumen % CO <sub>2</sub> nach Abzug der gelösten CO <sub>2</sub>				Reduziertes Gasvolumen nach Tabelle I	Alkalireserven in Volumen % CO <sub>2</sub> nach Abzug der gelösten CO <sub>2</sub>			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
1	29,4	30,0	30,5	31,0	1	58,4	58,6	58,9	58,8
2	30,3	30,9	31,5	31,9	2	59,4	59,5	59,8	59,7
3	31,3	31,9	32,4	32,8	3	60,3	60,5	60,7	60,6
4	32,3	32,8	33,4	33,8	4	61,3	61,4	61,7	61,6
5	33,2	33,8	34,3	34,7	5	62,3	62,4	62,6	62,5
6	34,2	34,7	35,3	35,6	6	63,2	63,3	63,6	63,4
7	35,2	35,7	36,2	36,5	7	64,2	64,3	64,5	64,3
8	36,1	36,6	37,2	37,4	8	65,2	65,3	65,5	65,3
9	37,1	37,6	38,1	38,4	9	66,1	66,2	66,4	66,2
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1
1	39,1	39,5	40,0	40,3	1	68,1	68,1	68,3	68,0
2	40,0	40,4	40,9	41,2	2	69,0	69,1	69,2	69,0
3	41,0	41,4	41,9	42,1	3	70,0	70,0	70,2	69,9
4	42,0	42,4	42,8	43,0	4	71,0	71,0	71,1	70,8
5	42,9	43,3	43,8	43,9	5	71,9	72,0	72,1	71,8
6	43,9	44,3	44,7	44,9	6	72,9	72,9	73,0	72,7
7	44,9	45,3	45,7	45,8	7	73,9	73,9	74,0	73,6
8	45,8	46,2	46,6	46,7	8	74,8	74,8	74,9	74,5
9	46,8	47,1	47,5	47,6	9	75,8	75,8	75,8	75,4
0,60	47,7	48,1	48,5	48,6	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4
1	48,7	49,0	49,4	49,5	1	77,8	77,7	77,7	77,3
2	49,7	50,0	50,4	50,4	2	78,7	78,6	78,7	78,2
3	50,7	51,0	51,3	51,4	3	79,7	79,6	79,6	79,2
4	51,6	51,9	52,2	52,3	4	80,7	80,5	80,6	80,1
5	52,6	52,8	53,2	53,2	5	81,6	81,5	81,5	81,0
6	53,6	53,8	54,1	54,1	6	82,6	82,5	82,4	82,0
7	54,5	54,8	55,1	55,1	7	83,6	83,4	83,4	82,9
8	55,5	55,7	56,0	56,0	8	84,5	84,4	84,3	83,8
9	56,5	56,7	57,0	56,9	9	85,5	85,3	85,2	84,8
0,70	57,4	57,6	57,9	57,9	1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

Eine tabellarische Übersicht der Mineralbestandteile des Organismus gibt folgende Tabelle nach THANNHAUSER, Lehrbuch der Stoffwechselkrankheiten.

## Mineralstoffe im Serum.

	mg % Grenzwerte	mg % Mittelwerte	Konzentration in Äquivalenten
Cl. . . . .	320—400	355	0,100 n
HCO <sub>3</sub> . . . . .	—	160	0,026 n
SO <sub>4</sub> . . . . .	—	22	0,002 n
HPO <sub>4</sub> . . . . .	3—15	10	0,002 n
Na . . . . .	280—320	300	0,130 n
K . . . . .	16—24	20	0,005 n
Ca . . . . .	8—16	10	0,005 n
Mg . . . . .	1—4	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	0,002 n
	Summe	880	saure: 0,133 n bas.: 0,142 n

## Mineralstoffe in Organen (mg %).

	Na	K	Ca	Mg	Cl	Gesamt HPO <sub>4</sub>	wasser- lösl. HPO <sub>4</sub>
Haut (Kaninchen)	179	204	18,2	8,5	—	—	—
Gehirn . .	—	150—300	4—41	15	131—145	1000	250
Skelet- muskel . .	150—89	330—400	3—19	20—30	etwa 60	500—700	470—650
Herz . . .	110	340	7—26	17,4	100—170	630	—
Lunge . .	—	—	14—32	—	210—260	260	—
Leber . .	—	—	5—20	9—17	96—207	800-1200	—

## II. Organische Bestandteile.

**Hämoglobin.** Das Hämoglobin kann nach zwei Methoden bestimmt werden: auf Grund seiner Fähigkeit O<sub>2</sub> oder CO pro Gramm in bestimmter Menge zu binden (1 g Hgb bindet bei 760 mm und 0°C 1,34 cmm O<sub>2</sub>) und durch seine Farbeigenschaften. Praktisch kommt nur letztere in Betracht und wenn auch die gebräuchlichen Methoden nicht sehr genau sind, so entsprechen

sie doch den praktischen Bedürfnissen. Ein Mißstand hat sich jedoch eingestellt und das ist die Unsicherheit für den Normalwert, den man als 100% Hgb bezeichnet. Die Angaben hierfür schwanken von 14—18 g und es ist selbstverständlich, daß die hiervon prozentual angegebenen Werte noch weiter schwanken je nachdem, welcher Normalwert als Bezugszahl genommen wird. Es ist deshalb durchaus zu begrüßen, wenn alle Werte für Hgb, wie es ebenso bei allen anderen Stoffen im Blut geschieht in Gramm pro 100 ccm angegeben werden. Man wird sich sehr bald an diese Zahlen gewöhnen und ihren normalen oder anormalen Wert beurteilen lernen. Es kommt hinzu, daß die von SAHLI angesetzte Skala so hoch ist, daß normale Männer nur 80, Frauen nur 70% Hgb haben. Diese Werte müssen also in der Praxis korrigiert werden und es sind zu allem Überfluß auch sogenannte korrigierte Sahli-Röhrchen in Gebrauch. Es wäre vollkommen ausreichend, wenn der praktisch am meisten gebrauchte Apparat nach SAHLI nicht eine Einteilung in % des Normalwertes, sondern in g-% erhielte.

*Prinzip.* Die Methode von SAHLI gründet sich darauf, daß Blut in  $n/_{10}$  HCl nach kurzer Zeit salzsaures Hämatin bildet und daß durch Verdünnen die Farben der Probe und eines Vergleichstabes gleich gemacht werden. Der Verdünnungsgrad gibt gleichzeitig ein Maß für die Menge vorhandenen Hgb.

*Ausführung.* Man füllt das Vergleichsröhrchen des Apparates, der wie ein Walpolscher Komparator gebaut ist, mit  $n/_{10}$  HCl bis zur Marke, fügt aus einer Capillarpipette 20 mm<sup>3</sup> Blut hinzu, spült die Pipette mit der Flüssigkeit aus und vergleicht nach 1 Minute, indem man gewöhnliches Wasser unter Mischen so lange zugibt, bis die Farbe der Probe und des Vergleichstabes gleich sind. Aus der Skala an dem speziell geeichten Proberöhrchen ergibt sich unmittelbar der Hgb-Gehalt. Die Farbe des Vergleichstabes ist öfter zu kontrollieren; da auch normale Werte um  $\pm 20\%$  des Mittelwertes schwanken, muß die Kontrolle mit Hilfe der Sauerstoffbindung des Hgb durchgeführt werden. Die Methode von BÜRKER liefert genauere und direkte Werte in g-%, sie ist aber umständlicher und in der Praxis wird keine solche Genauigkeit verlangt.

**Reststickstoff.** Der Stickstoff des Blutes oder Serums, auch von Geweben, Drüsen usw., ist einerseits im Eiweiß enthalten (Durchschnitt 16,0%) und andererseits in solchen Stoffe, die mit den meisten der sogenannten Eiweißfällungsmitteln nicht gefällt werden. Hierzu gehören:

	Gehalt im Serum in mg %	
	Normaler	Maximaler pathol.
Harnstoff . . . . .	30—50	700
Harnsäure . . . . .	2—4	50
Kreatin-N und Kreatinin-N } . . . . .	1—2	—
Aminosäuren N <sub>2</sub> . . . . .	5—8	bis 200
Bilirubin . . . . .	0,1—0,8	5,0
Indikan . . . . .	bis 0,1	bis 2,5
Ammoniak-N . . . . .	0,02—0,04	—
Rest N . . . . .	25—40	500

Man faßt den Stickstoffgehalt dieser gesamten Stoffe unter dem Begriff Reststickstoff zusammen, dessen physiologische Grenzen ziemlich weit schwanken, dessen Kenntnis aber für die Diagnose bei allen Formen der Nephritis, Anurie und der Urämie äußerst wichtig ist. Auch bei Lebererkrankungen, Herzfehlern und Chlorverlusten findet sich eine Steigerung. Daneben sind mitunter die Einzelfractionen zur Frühdiagnose (Indican) ebenfalls von Bedeutung. Die Bestimmung des Harnstoffs wird oft wegen der leichten und schnellen Methodik vorgezogen.

*Methodik, Prinzip.* Ebenso wie im Organismus aller Stickstoff der Nahrung in  $\text{NH}_3$  umgewandelt wird, kann man in vitro dasselbe erreichen, wenn man die Lösung der organischen Substanzen mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kocht, der man etwas  $\text{CuSO}_4$  zusetzt um eine schnellere Verbrennung des Kohlenstoffs zu erreichen. Der gesamte N bleibt als  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zurück, wird mit  $\text{NaOH}$  oder  $\text{KOH}$  als  $\text{NH}_3$  in Freiheit gesetzt, überdestilliert, in einer bestimmten Menge einer  $n/100$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  aufgefangen und der Überschuß der Säure titrimetrisch bestimmt. Methode von KJELDAHL. Sind die  $\text{NH}_3$ -Mengen sehr klein, so verwendet man  $n/200$  bis  $n/500$ -Säure. Nun ist mit gewöhnlichen Indikatoren, zum Beispiel Neutralrot, der Umschlagspunkt bei der Neutralisation in so verdünnten Lösungen nur schwer zu erkennen und wegen der großen Verdünnung an sich schon fehlerhaft. Deshalb benutzt man die Tatsache, daß sich  $\text{HJO}_3$  und  $5 \text{HJ} = 3 \text{J}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$  umsetzen, um die Säure „jodometrisch“ zu bestimmen.

$\text{KJO}_3$  und  $\text{KJ}$  reagieren nämlich nicht miteinander, deshalb wird nur so viel Jod frei, wie durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aus  $\text{KJO}_3$  und  $\text{KJ}$  die entsprechenden Säuren  $\text{HJO}_3$  und  $\text{HJ}$  in Freiheit gesetzt werden. Das ausgeschiedene Jod läßt sich mit Natriumthiosulfat und Stärke sehr genau titrieren (vgl. S. 10).

*Reagenzien.*

1. 10% Trichloressigsäure zum Enteiweißen.
2. Etwa 2 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (9%).
3. Genau  $n/100$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
4.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 Vol.-% puriss mit 3%  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$  (eventuell mit  $\text{HClO}_4$  oder Cerisulfat).
5. 33%  $\text{NaOH}$ .
6. 1% Stärke.
7. Mischung von  $n/10$   $\text{KJO}_3$  und  $n/10$   $\text{KJ}$  in brauner Flasche mit einem Tropfen  $\text{Hg}$  um Jodausscheidung zu verhindern.
8.  $n/100$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dessen Titer jeweils gegen die genau  $n/100$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  festgestellt wird.

*Apparatur.* Ein Veraschungsgestell (Abb. 22). Eine Destillationsapparatur nach PREGL (Abb. 23). Bei dem Veraschungs-

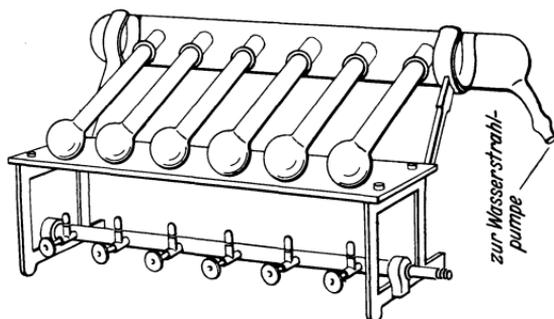


Abb. 22. Veraschungsgestell nach PAUL HAACK, Wien.

gestell ist empfehlenswert eine Konstruktion, bei der die Hälse der Kjeldahlkolben in ein gemeinsames Glasrohr ragen, aus dem die stark sauren Dämpfe bei der Verbrennung durch eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden (Abb. 22). Bei der Destillationsapparatur ist zu empfehlen, das Ammoniak aus dem Veraschungskolben durch Durchblasen von Wasserdampf überzudestillieren, wozu Apparate der verschiedensten Konstruktion vorhanden sind, die im Prinzip, aber so wie Abb. 23 darstellt, arbeiten. Wird das Blut nicht sofort enteiweißt, so versetzt man je 10 ccm um die Gerinnung zu verhüten mit 10–20 mg reinstem  $\text{Na ad K-Oxalat}$ . Hiervon pipettiert man dann genau 5 ccm in einen Meßkolben mit 30 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ , wartet die Hämolyse ab und gibt 10 ccm 10% Trichloressigsäure unter gutem Schütteln dazu. Der entstehende Niederschlag muß eine braune Farbe haben, sonst gibt man noch tropfenweise Trichloressigsäure hinzu, schüttelt wieder und füllt alsdann auf 50 ccm auf. Nach 15 Minuten kann filtriert werden.

Vom Filtrat werden zweimal genau 10 ccm in den Kjeldahlkolben getan, mit 1 ccm konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und mit je zwei Glasperlen vorsichtig erhitzt und so lange gekocht, bis alles Wasser verdampft ist und eine grünliche klare Lösung in der übrigbleibenden konzentrierten  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vorhanden ist. Ein Leerwert,

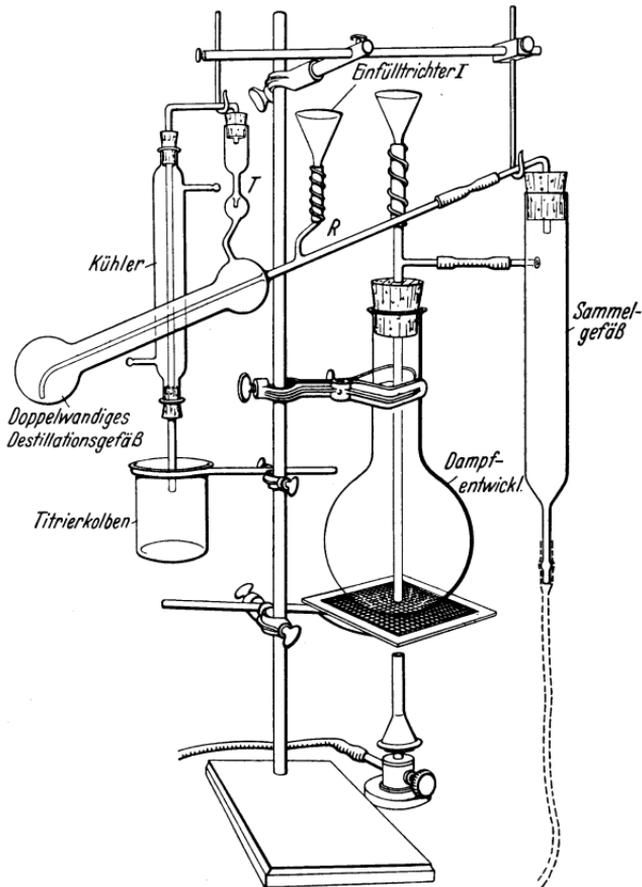


Abb. 23. Destillationsapparat zur Bestimmung des Rest N mit automatischer Entleerung.

der statt Blut destilliertes Wasser enthält, wird gleicherweise behandelt. Man läßt erkalten, verdünnt mit wenig Wasser und spült den Inhalt des Kolbens *quantitativ* durch Einfülltrichter I in den Apparat über, indem man den Kjeldahlkolben mehrfach mit wenig Wasser ausspült. Unter den Kühler des Destillationsapparates setzt man einen etwa 150 ccm fassenden Erlenmeyerkolben oder Becherglas, der 10 ccm  $n_{/100} \text{H}_2\text{SO}_4$  (sehr genau

abmessen) enthält, gibt durch den Trichter I 3 ccm 33% Natronlauge und beginnt mit dem Durchblasen von Wasserdampf. Das K hlerrohr muß in die vorgelegte Schwefelsäure eintauchen und die Dampfentwicklung so geregelt werden, daß das untere K hlerrohr sich nicht erwärmt. Nach 10 Minuten wird das Vorlagegefäß so tief gesetzt, daß das K hlerrohr nicht mehr eintaucht, man läßt noch weitere 10 Minuten abdestillieren und entfernt sodann die Vorlage, in welche man 3 ccm des  $KJ_3$ - $KJ$ -Gemisches gibt. Das ausgeschiedene Jod wird aus einer Mikrob urette mit  $n/_{100}$ -Thio-sulfat und Stärke als Indikator titriert.

Es ist ratsam, der  $n/_{100}$ -Schwefelsäure einen Tropfen Phenolphthal in zuzusetzen, damit man an der Rotfärbung erkennen kann, ob etwa die  $H_2SO_4$  von dem  berdestillierenden  $NH_3$  vollständig verbraucht wurde. Man kann, um die Analyse zu retten, oft noch eine abgemessene Menge  $n/_{100}$   $H_2SO_4$  nachfüllen. Es sollen immer 25%  $H_2SO_4$  im Überschuß sein. Werden neue Apparate in Betrieb genommen oder haben alte lange gestanden, so bläst man am besten einige Zeit, ohne das Kühlwasser anzustellen, reinen Wasserdampf durch. Die Kühlung darf danach erst angestellt werden, wenn der Apparat erkaltet ist. Das Wasser des Dampfentwicklers soll mit Schwefel- oder Phosphorsäure angesäuert sein. Kessel aus Kupfer geben einen konstanteren Dampfstrom als Glaskolben, das Wasser darf hier nicht angesäuert werden. Das Titrationsergebnis des Leer-versuches ist bei jedem Hauptversuch in Abzug zu bringen.

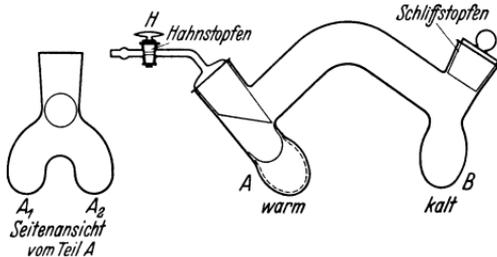


Abb. 24. Vakuumpappatur zur Bestimmung des Rest N und Harnammoniaks nach HINSBERG.

Kühlung darf danach erst angestellt werden, wenn der Apparat erkaltet ist. Das Wasser des Dampfentwicklers soll mit Schwefel- oder Phosphorsäure angesäuert sein. Kessel aus Kupfer geben einen konstanteren Dampfstrom als Glaskolben, das Wasser darf hier nicht angesäuert werden. Das Titrationsergebnis des Leer-versuches ist bei jedem Hauptversuch in Abzug zu bringen.

*Vakuumpappatur.* Eine einfache Apparatur ist die nach Abb. 24. Sie arbeitet nach folgendem Prinzip: Ammoniak ist aus saurer Lösung nicht flüchtig, weil es als Salz gebunden ist. In alkalischer Lösung, besonders aber im Vakuum ist es sehr leicht flüchtig. Erfolgt die Destillation in einem abgeschlossenen Vakuum, wie es in dem oben dargestellten Apparat (Abb. 24) möglich ist, so hat dies den Vorteil, daß die Destillation schnell erfolgt und ohne Wartung, weil nur eine beschränkte Flüssigkeitsmenge in dem abgeschlossenen Raum destillieren kann. Das Volumen der Flüssigkeit bleibt konstant und daher ist die Titration sehr genau. Die Konstruktion ist aus der Abbildung zu ersehen und die Hand-

habung folgende: Man gibt in den Teil  $A_1$  einen bestimmten Teil des veraschten Blutfiltrates, z. B. 3 ccm, welches man in kleinen Kjeldahlkolben von 10 ccm auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt hat. Die Veraschungskolben haben folgende Form: Abb. 25.

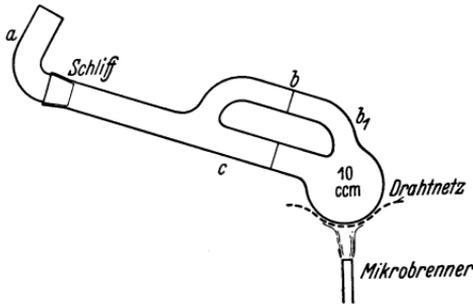


Abb. 25. Veraschungskolben zur Rest N-Bestimmung nach HINSBERG.

Das gebogene Ansatzrohr  $a$  ist mit einem kurzen Schliff angesetzt und verhindert, daß Substanzverlust durch Spritzen eintritt. Die Dämpfe steigen durch den Schenkel  $b$  hoch und das Kondensationsprodukt fließt durch  $c$  zum Kolben zurück. Der Kolben wird in einer Klammer lose eingespannt und der Inhalt über einem kleinen Drahtnetz mit Mikrobrenner verascht. Dabei muß der Teil  $b_1$  senkrecht stehen, damit durch Stoßen keine Flüssigkeit herausgeschleudert wird. Außerdem gibt man ein etwa 1 cm langes Stück einer einseitig zugeschmolzenen Glascapillare in den Kolben. Zum Veraschen pipettiert man z. B. 5 ccm eiweißfreies Serumfiltrat in den

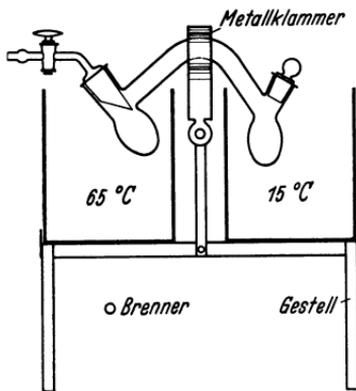


Abb. 26. Doppeltes Wasserbad zur Vakuumpumpe.

Kolben (= 0,5 ccm Blut), gibt dazu 0,5 ccm Schwefelsäure mit Kupfersulfat, verascht vollkommen, füllt dann bis zur Marke 10 ccm auf und entnimmt nach dem Mischen 3 ccm zur Destillation (= 0,15 ccm Blut). In  $A_2$  gibt man die nötige Menge Natronlauge (1 ccm) und in Teil B z. B. 3,00 ccm  $n/100$   $H_2SO_4$ . Dann werden die gefetteten Schliffstopfen eingesetzt, durch Hahn H an der Wasserstrahlpumpe evakuiert, dieser wieder geschlossen und danach der Inhalt von  $A_1$  und  $A_2$  vorsichtig gemischt, damit

der Inhalt von A nicht heftig siedet. Das Ganze kommt mit Teil A in ein Wasserbad (Abb. 26) von etwa  $65^\circ$  und mit Teil B in ein solches von  $15^\circ$  und es destilliert innerhalb 30 Minuten das gesamte Ammoniak nach Teil B. Ist die Destillation beendet, so kann der Apparat verschlossen beliebig lange stehen, ohne

daß sich das Resultat ändert. Zur Titration wird das Vakuum aufgehoben, die Stopfen entfernt und der Säureüberschuß jodometrisch wie oben angegeben bestimmt. Den Leerwert braucht man so lange dieselben Reagenzien benutzt werden nur einmal zu bestimmen, weil die störenden Einflüsse der Luft fortfallen, da die Destillation in einem abgeschlossenen Raum stattfindet.

Mit dieser Anordnung lassen sich noch 0,02 mg Stickstoff mit einer Genauigkeit von  $\pm 5\%$  bestimmen, d. h. der Reststickstoff in 0,1 ccm Blut.

*Berechnung* des Rest N. 1 ccm  $n/_{100}$   $H_2SO_4$  entspricht 0,17 mg  $NH_3$  oder 0,14 mg  $N_2$ .

Der Titer der Thiosulfatlösung sei gefunden zu 0,971 (vgl. S. 7).

Verascht wurden z. B. 10 ccm Filtrat und destilliert. Vorgelegt wurden 10 ccm  $n/_{100}$   $H_2SO_4$ , zurücktitriert 4,68 ccm Thiosulfat, das ist reduziert  $4,68 \cdot 0,971 = 4,54$  ccm. Mithin verbraucht 5,46 ccm  $n/_{100}$   $H_2SO_4 = 5,46 \cdot 0,14 = 0,765$  mg  $N_2$ . Diese waren enthalten in 10 ccm Filtrat = 1 ccm Blut, ergibt einen Rest N von 76,5 mg-%. War ein Leerwert vorhanden z. B. 0,36 ccm  $H_2SO_4$  verbraucht, so errechnet sich aus dem Resultat  $5,46 - 0,36 = 5,10$  ccm  $n/_{100}$   $H_2SO_4$  verbraucht, entsprechend im Blut 0,713 mg N = 71,3 mg-% Rest N.

Mit der *Vakuumpappatur* ergibt sich folgende Rechnung:

<i>Hauptversuch</i> $n/_{100}$ $H_2SO_4$ vorgelegt . . .	3,00 ccm
Thiosulfat verbraucht 2,210 ccm (Titer 0,971)	
Thiosulfat reduziert . . . . .	<u>2,146 ccm</u>
$H_2SO_4$ verbraucht. . . . .	0,854 ccm
<b>Leerwert:</b> $n/_{100}$ $H_2SO_4$ vorgelegt . . . . .	3,00 ccm
Thiosulfat titriert 3,04 . . . . (Titer 0,971)	
$n/_{100}$ Thiosulfat reduziert . . . . .	<u>2,95 ccm</u>
$H_2SO_4$ verbraucht . . . . .	0,05 ccm

Wirklicher Verbrauch = 0,804 = 0,1125 mg  $N_2$ . Verascht 0,5 ccm Blut (5 ccm Filtrat) aufgefüllt ad 10 ccm, davon 3 ccm = 0,15 ccm Blut. Mithin 0,1125 mg  $N_2$  in 0,15 ccm Blut. 72,5 mg  $N_2$  in 100 ccm Blut.

**Gesamt N.** Ebenso wie man den Reststickstoff bestimmt, nachdem man das Eiweiß entfernt hat, kann man auch den Gesamtstickstoff des Blutes bestimmen. Man wird zu diesem Zweck etwa 0,1 ccm Vollblut oder Serum direkt in den Kjeldahlkolben pipettieren mit  $H_2SO_4 \cdot CuSO_4$  versetzen und veraschen. Dies dauert naturgemäß wegen der größeren Menge organischer Stoffe,

<sup>1</sup> Die Apparatur ist zu beziehen durch E. MÜLVERT, Wiesbaden, Frankfurter Straße 31.

besonders Eiweiß, länger, in jedem Falle muß man eine vollständig klare Lösung in konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abwarten. Der Veraschungsrückstand der auch hier allen  $\text{N}_2$  als  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enthält, wird, wie zuvor beschrieben, bestimmt. Wesentlich ist die Bestimmung des ges.  $\text{N}_2$  für den Harn, umgerechnet auf die Tagesausscheidung um das Stickstoffgleichgewicht kontrollieren zu können.

Der Methodik ist nichts Neues hinzuzufügen. Es läßt sich aus der Differenz von ges. N und Rest N der Eiweißstickstoff berechnen aus dem durch Multiplikation mit 6,25 der Eiweißgehalt zu bestimmen ist.

Zum Beispiel: ges. $\text{N}_2$ gefunden . .	1326 mg-%
Rest $\text{N}_2$ . . . . .	46
Eiweiß $\text{N}_2$ . . . . .	<u>1280 mg-%</u> . 6,25 =
Eiweiß	8,00%.

Der Eiweißgehalt ist aber einfacher durch Refraktion zu bestimmen.

*Xanthoproteinreaktion.* Bei Niereninsuffizienz gehen hohe Xanthoprotein- und Indikanwerte fast parallel. Beide zeigen eine Vermehrung der Darmfäulnisprodukte im Serum an, und beruhen auf aromatischen Abkömmlingen des Tyrosins und Tryptophans. Beim Gesunden ist der Gehalt des Serums an diesen Stoffen sehr gering, vermehrt bei Niereninsuffizienzen, Urämie, wo sie oft in Verbindung mit Harnstoff und Rest N-Bestimmungen differentialdiagnostisch verwertet wird.

*Prinzip.* Die aromatischen Stoffe werden durch Salpetersäure nitriert, und die entstandenen Nitroverbindungen lösen sich mit gelb-brauner Farbe in Natronlauge.

*Reagenzien.* 1. 20% Trichloressigsäure.

2. Konzentrierte  $\text{HNO}_3$  spezifisches Gewicht 1,4.

3. Reine 33% Natronlauge.

*Ausführung.* Das Serum wird mit gleichen Mengen 20%iger Trichloressigsäure versetzt, gemischt und filtriert. Das klare eiweißfreie Filtrat wird mit  $\frac{1}{4}$  seines Volumens an konzentrierter  $\text{HNO}_3$  versetzt und  $\frac{1}{2}$  Minute in *leichtem* Kochen gehalten, abgekühlt und etwa die Hälfte des Volumens Natronlauge zugefügt. Normalerweise erfolgt Gelbfärbung, die in pathologischen Fällen gelbbraun bis braun ist und nach einiger Übung gut geschätzt werden kann, besonders wenn man öfter Normalproben daneben macht.

Nach den Angaben von BECHER läßt sich die Farbe in einem Authenriethschen Colorimeter gegen verdünnte  $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung vergleichen und aus den Zahlen wesentliche Schlüsse für die Differentialdiagnose ziehen.

**Harnstoff.** Der Harnstoff macht den wesentlichsten Anteil des sogenannten Rest N (siehe dort) aus. Sein Anteil am Rest N ist nicht konstant und ist besonders bei Niereninsuffizienz sowohl anteilmäßig wie absolut erhöht. Seine Bestimmung bietet zweifellos in manchen Fällen ein Kriterium zur schnellen Diagnose einer Niereninsuffizienz und die Bestimmung, wenigstens mit diagnostisch genügender Genauigkeit, ist sehr einfach und schnell ausführbar. Die genaueste aber umständliche Methode ist die gravimetrische mit Xanthhydrol; auch durch fermentative Spaltung in  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  läßt sich der Harnstoffgehalt ermitteln, die einfachste ist aber sicher die Bromlauge methode von KOWARSKY.

*Prinzip.* Ein Ureometer, wie nebenstehende Abb. 27, wird mit einer konzentrierten Salzlösung gefüllt, damit sich die Absperrflüssigkeit und das Blutfiltrat nicht mischt. Das Blutfiltrat wird durch den Trichter A eingefüllt, Bromlauge zugesetzt und nach Beendigung der Gasentwicklung der Flüssigkeitsspiegel in beiden Schenkeln gleich hoch eingestellt, das Volumen abgelesen und die Harnstoffmenge aus der beifolgenden Tabelle entnommen. Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema :

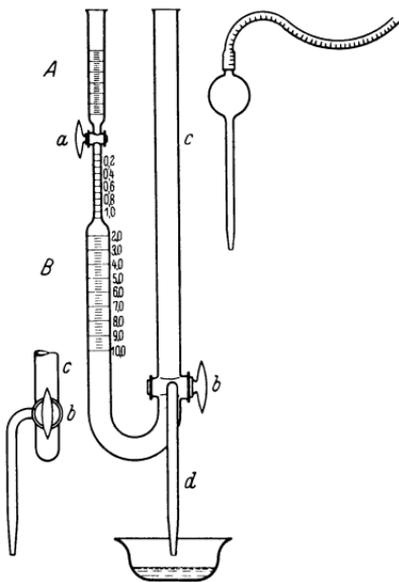
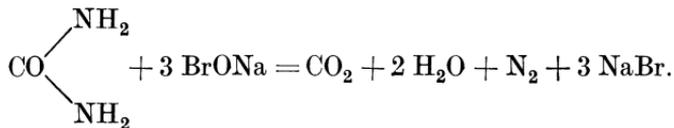


Abb. 27. Ureometer nach KOWARSKY.



Davon entweicht nur der  $\text{N}_2$  gasförmig, während  $\text{CO}_2$  von der Lauge gebunden wird.

Aus der Gleichung ergibt sich, daß aus jedem Molekül Harnstoff 1 Mol Stickstoff frei wird, welcher, wie alle Gase bei  $0^\circ$  und 760 mm Hg, einen Raum von 22 400 ccm einnimmt. Diese 22 400 ccm wiegen 28,00 g (Molekulargewicht des Stickstoffs) und so ist es möglich aus dem Volumen des Stickstoffs das Gewicht des in Reaktion getretenen Harnstoffes zu berechnen.

*Reagenzien.* 1. Konzentrierte Salzlösung: 150 g  $K_2SO_4$  und 350 g NaCl werden mit 1 l Wasser bis zum Kochen erhitzt und nach dem Abkühlen vom Unlöslichen abfiltriert.

- |                             |   |   |
|-----------------------------|---|---|
| 2. 40% NaOH                 | } | Bromlauge aus 20 ccm NaOH +<br>40 Tropfen Brom in einen Misch-<br>zylinder mit Glasstopfen. |
| 3. Brom in kl. Tropfflasche |   |   |
| 4. 10% Trichloressigsäure.  |   |   |

*Ausführung.* Man mischt in einem Zentrifugenglas gleiche Teile Blut oder Serum und Lösung 4, zentrifugiert 10 Minuten und nimmt von der klaren Flüssigkeit 2,5 bis 5 ccm in den Teil A des Apparates, nachdem B und C mit der Lösung 1 gefüllt waren. Der Dreiweghahn, Hahn b, wird so gestellt, daß Flüssigkeit aus B durch d abfließen kann, wenn a geöffnet wird, wodurch gleichzeitig eine zu bestimmende Menge Blutfiltrat nach B gelangt und ein entsprechender Teil der Lösung 1 durch d abfließt, während der Teil C abgesperrt ist; a wird wieder geschlossen und der Trichter A mehrmals mit Wasser mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und Saugrohr ausgewaschen, dann mit Bromlauge gefüllt und davon 5 ccm nach B abfließen lassen. Die Gasentwicklung beginnt sofort und ist nach etwa 10 Minuten beendet. Jetzt wird aus Teil C durch entsprechende Drehung von b soviel Flüssigkeit abgelassen, daß das Niveau in B und C gleich ist, während die Flüssigkeiten durch den Dreiweghahn kommunizieren. Das Gasvolumen wird abgelesen, Temperatur und Barometer festgestellt und der entsprechende Wert aus der Tabelle entnommen. Dieser gibt die Gramm Harnstoff pro Liter für 1 ccm gefunden  $N_2$  an, was in der Ausrechnung zu berücksichtigen ist. Zum Beispiel gefunden 0,553 ccm  $N_2$  755 mm und  $20^\circ C$  (Faktor 1,95).

Tabelle zur Harnstoffbestimmung (nach KOWARSKY).  
1 ccm Stickstoff entspricht Grammen Harnstoff im Liter.  
Temperatur in Celsiusgraden.

Barometer	10°	12°	14°	16°	18°	20°	22°	24°	25°
710	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,83	1,81	1,80	1,78
720	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87	1,85	1,84	1,82	1,80
725	1,95	1,93	1,92	1,90	1,89	1,87	1,85	1,83	1,82
730	1,97	1,94	1,93	1,91	1,90	1,88	1,87	1,85	1,83
735	1,98	1,96	1,94	1,93	1,91	1,89	1,88	1,86	1,84
740	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92	1,90	1,89	1,87	1,86
745	2,01	1,99	1,98	1,96	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87
750	2,02	2,00	1,99	1,97	1,95	1,93	1,92	1,90	1,88
755	2,04	2,02	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,92	1,90
760	2,05	2,03	2,01	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,91
765	2,06	2,05	2,03	2,01	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92
770	2,08	2,06	2,04	2,02	2,00	1,98	1,97	1,95	1,93

Der Leerwert ergab 0,04 ccm  $N_2$  aus 5 ccm Bromlauge + 2,5 ccm Trichloressigsäure auf das Doppelte mit Wasser verdünnt. Aus dem Blut stammen demnach 0,513 ccm = 1,00 g Harnstoff im Liter (100 mg-%). Die Tabelle gilt *nur* bei 2,5 ccm Filtrat = 1,25 ccm Blut und der Faktor ist bei 5 ccm Filtrat zu halbieren und bei 1,25 ccm Filtrat zu verdoppeln. Die Menge Filtrat richtet sich nach der Menge Harnstoff, besonders im Harn.

Auch Harn läßt sich nach dieser Methode sehr gut verarbeiten, er ist aber stets doppelt und bei einem spezifischen Gewicht über 1,01 vierfach zu verdünnen, auf jeden Fall mit Trichloressigsäure zu fällen. Die Gesamtharnstoffausscheidung beträgt beim Mann etwa 30 g pro die, bei der Frau etwa 27 g pro die mit großen individuellen Schwankungen.

**Harnsäure im Blut.** Jedes Blut enthält Harnsäure, die aber nur dann einen vergleichbaren Wert hat, wenn der Patient mindestens 3 Tage völlig purinfreie (fleischlose) Kost erhalten hat. Außerdem soll das Blut morgens nüchtern entnommen sein und zur Bestimmung wird stets Serum verwendet. Der normale Harnsäurewert im menschlichen Serum ist 2—4 mg-% und steigt sowohl im Laufe eines Tages bei der Nahrungsaufnahme wie besonders bei einigen Erkrankungen Gicht, Herzinsuffizienz, Leukämie u. a. Diagnostisch wertvoll ist der Harnsäuregehalt unter den oben angeführten Bedingungen bei einer beginnenden Niereninsuffizienz. Bei der Gicht sind 5—10 mg oft vorkommende Zahlen und es sind auch Werte von 50 mg-% berichtet worden.

Das Prinzip der Methode ist, daß Harnsäure ein speziell zusammengesetztes Reagens zu reduzieren vermag, ohne daß andere Serumbestandteile nach Entfernung der Proteine stören, und die dabei auftretende blaue Farbe colorimetrisch bestimmt wird. Gerade hier ist das Absolutcolorimeter besonders geeignet, weil die Harnsäurestandardlösungen sehr rasch zersetzt werden und dies zu wesentlich höheren Werten führen kann.

*Reagenzien:* Die Methode ist von THANNHAUSER modifiziert worden und braucht folgende Reagenzien.

1. *Harnsäurereagens.* 100 g Na-Wolframat (MERCK) werden in einem 2 l fassenden Rundkolben in 600 ccm  $H_2O$  gelöst, 50 g reines Arsenpentoxyd (Arsensäureanhydrid) zugesetzt 25 ccm einer 85 % syrupösen Phosphorsäure zugegeben und mit 20 ccm konzentrierter HCl (spezifisches Gewicht 1,19) 20 Minuten lang gekocht, abgekühlt und auf 1 l aufgefüllt und filtriert.

2. Cyanidlösung: 50 g frisches NaCN werden in 335 ccm einer 0,4% NaOH gelöst. (Die Lösung soll vor Gebrauch 2 Wochen stehen. Nur mit Bürette abmessen.)

3. Harnsäurestandard nach FOLIN: reinste Harnsäure wird im Vakuumexsiccator über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  48 Stunden in *dünner* Schicht getrocknet, davon genau 1,000 g analytisch abgewogen und quantitativ durch einen Trichter in einen Meßkolben von 1000 ccm gespült, wozu man eine Lösung von 0,5 Lithiumcarbonat in 150 ccm Wasser, bei  $60^\circ$  gelöst, verwendet. Man kühlt ab, fügt noch etwa 300 ccm Wasser zu, auch 25 ccm 40% Formalin und 3 ccm Eisessig. Sobald die Kohlensäure entfernt ist, wird genau ad 1000 ccm aufgefüllt, bzw. wenn man etwas mehr Harnsäure abgewogen hatte, auf ein entsprechend größeres Volumen (vgl. hierzu S. 7).

4. 10% Na-Wolframat.

5. 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

*Ausführung.* In einen 100 ccm Meßkolben gibt man etwa 80 ccm Wasser, genau 5 ccm Serum, 5 ccm Na-Wolframat und 5 ccm 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , schüttelt gut, füllt ad 100 ccm auf, filtriert nach  $\frac{1}{2}$  Stunde. 80 ccm Filtrat kommen in einen frischen 100 ccm Meßkolben, dazu 5 ccm der Cyanidlösung *aus einer Bürette!* (Das Pipettieren ist sehr gefährlich) und 2 ccm Harnsäure Reagens, füllt auf 100 ccm auf und colorimetriert nach 5 Minuten. Als Standardlösung oder als Vergleichslösung zur Herstellung der Eichkurve für das Absolutcolorimeter verdünnt man die Harnsäure-Standardlösung fünffach mit Wasser (20 mg-%) und stellt hiervon Verdünnungen her, die 1–10 mg-% Harnsäure enthalten. Davon nimmt man je 5 ccm und behandelt sie genau so wie das Serum, einschließlich der Fällung des Eiweißes, bringt sie im Absolutcolorimeter zur Ablesung, oder sucht sich nur eine passende Konzentration aus, um nach DUBOSQ (vgl. S. 20) zu colorimetrieren. Die angegebenen Volumina können leicht auf die Hälfte bis ein Viertel reduziert werden.

Berechnung vgl. S. 22 bzw. 32.

**Harnsäure im Harn.** Die Harnsäurebestimmung im Harn ist bei Belastungsproben zur Bestimmung der Ausscheidung exogener Harnsäure wichtig, aber die Konzentration schwankt je nach der Tagesharnmenge in weiten Grenzen. Deshalb ist hier eine Absolutcolorimetrie mit festliegenden Eichkurven besonders geeignet. Der Harn ist vor der Bestimmung 1:20 zu verdünnen.

*Reagenzien.* 1. Harnsäurereagens wie oben.

2. 5% Na-Cyanid mit 2 ccm konzentrierter  $\text{NH}_3$  (25%) auf je 1000 ccm (*mit Bürette abmessen*), 6–8 Wochen haltbar!

3. Harnsäurestandard: 1–10 ccm Harnsäurestandard (siehe oben) werden auf 100 ccm verdünnt (5–10 Proben) und hiervon

je 20 ccm entsprechend der Harnmenge zur Herstellung der Eichkurve benutzt oder bei direktem Vergleich eine dem verdünnten Harn entsprechende Konzentration gewählt.

*Ausführung.* 20 ccm verdünnter (1:20) Harn oder eine Standardlösung werden in einem großen Reagensglas mit 10 ccm der 5% Na-Cyanidlösung versetzt und 2 ccm Harnsäurereagens zugegeben. Dann wird sehr sorgfältig gemischt und nach 5 Minuten colorimetriert, und der Wert einer gleicherweise hergestellten Eichkurve entnommen (siehe S. 32).

**Bilirubin im Serum.** Auch das normale Serum ist gelb gefärbt, zum Teil von Bilirubin, zum Teil von Luteinen und Lipochromen. Gelbfärbung des Serums durch Gallenfarbstoff ist ein Zeichen von Leberinsuffizienz oder vermehrtem Blutzerfall (Icterus hämolyticus und Anämia perniciosa). Wegen der anderen im Serum vorkommenden gelben Farbstoffe, ist eine direkte Colorimetrie ausgeschlossen, aber eine Bestimmung ist möglich, wenn man mit Diazobenzolsulfosäure und Bilirubin einen roten Azofarbstoff erzeugt, der sowohl charakteristisch für Bilirubin ist (im Gegensatz zu Lutein usw.) als auch eine colorimetrische Schätzung gestattet. Man kann bei dieser Reaktion noch unterscheiden zwischen der sogenannten direkten und indirekten Reaktion, die diagnostisch wertvoll sind. Direkte Reaktion findet man bei allen Fällen von Verschlußikterus, eine verzögerte direkte bei Vergiftungen, Icterus catarrhalis und akuter gelber Leberatrophie. Bei direkter Reaktion liefert das Serum bereits einen Diazofarbstoff ohne Zusatz von Alkohol und zur Bestimmung desselben gehört neben der quantitativen Zahlenangabe auch die qualitative Probe *der direkten Reaktion*.

Man gibt in zwei kleine Reagensgläser je etwa 0,25 ccm Serum, dazu in das erste 0,2 ccm Diazolösung (siehe später) in das zweite als Vergleich 0,2 ccm Wasser. Tritt Rotfärbung innerhalb 30 Sekunden auf, so ist die direkte Reaktion positiv, tritt sie später innerhalb  $\frac{1}{2}$  Stunde ein, so ist sie positiv *verzögert*. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde wird sie als negativ bezeichnet. Ohne Rücksicht auf den Ausfall der Vorprobe wird jetzt die quantitative Schätzung vorgenommen.

Man kann Werte bis 0,5 mg-% *sicher* als normal bezeichnen, Werte über 1,0 mg-% sicher als pathologisch erhöht. Die Zwischenwerte sollen auch ohne pathologisch zu sein als individuell bedingt ohne krankhafte Symptome vorkommen.

*Prinzip der quantitativen Schätzung.* Das Prinzip beruht auf der Herstellung eines Farbstoffes. Da nun künstliche Bilirubin-

lösungen einen Farbstoff mit einem anderen Farbton als das native Bilirubin geben, ist es zweckmäßig die Bestimmung mit einem Colorimeter nach AUTHENRIETH (geeichter Vergleichskeil) nach HYMANS VAN DEN BERGH vorzunehmen; jedem Instrument liegt eine genaue Arbeitsanweisung bei und deshalb kann hier auf eine Darstellung verzichtet werden. Mit einfachsten Mitteln erzielt man eine klinisch ausreichende *Schätzung nach BAKALTSCHUK*.

*Reagenzien.* 1. 96% Alkohol.

2. Sulfanilsäure. 0,15 g Sulfanilsäure mit 1,5 ccm HCl (spezifisches Gewicht 1,19) ad 100 ccm H<sub>2</sub>O.

3. Natriumnitrit 0,5%.

4. Äther.

5. Physiologische NaCl-Lösung.

Man richtet 10 gleiche Reagensgläser und gibt in Nr. 2—10 je 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung. Mit einer feinen Stangenpipette in Röhrchen 1 einen ccm Serum und davon 0,5 ccm in Röhrchen 2, mischt gut und gibt davon 0,5 ccm in Röhrchen 3 usw. Den letzten ½ ccm verwirft man. Alle Röhrchen enthalten jetzt 0,5 ccm Lösung in aufsteigender Verdünnung. In jedes Reagensglas kommen nun 0,5 ccm Alkohol und 0,5 ccm frisches Diazoreagens, bestehend aus 6,4 ccm Lösung 2 mit 0,2 ccm Lösung 3, wodurch nach gutem Mischen Rosafärbungen in absteigender Intensität entstehen. Man überschichtet mit etwa 0,5 ccm Äther und kann nun sehr leicht gegen einen weißen Hintergrund im Kontrast mit dem farblosen Äther jenes Röhrchen erkennen, bei dem noch eben eine Farbe vorhanden ist. Dies enthält in 1 ccm Äther noch 0,0016 mg Bilirubin = 0,16 mg-%.

Berechnet man die Verdünnung, so kann der Bilirubingehalt des ursprünglichen Serums leicht ermittelt werden. Zum Beispiel das siebente Röhrchen ist noch eben gefärbt, demnach enthält das

sechste . . . . .	0,32 mg-%	0,16 · 2
fünfte . . . . .	0,64 „	0,16 · 4
vierte . . . . .	1,28 „	0,16 · 8
dritte . . . . .	2,56 „	0,16 · 16
zweite . . . . .	5,12 „	0,16 · 32
erste (unverdünnt) . .	10,24 „	Bilirubin = 0,16 · 64.

Die Reihe kann meistens stark abgekürzt werden, da nur die Grenzverdünnung bestimmt werden muß. Eine colorimetrische Bestimmung im Dubosq- oder Absolutcolorimeter ist nicht empfehlenswert und die primitive Methode von BAKALTSCHUK klinisch ausreichend. Auf gleiche Weise kann das Bilirubin ebenfalls in der Galle bei entsprechender Verdünnung bestimmt werden.

**Blutzucker.** Das Blut enthält normalerweise 80—120 mg-% Dextrose; der Wert ist bei jedem Menschen *morgens nüchtern* außerordentlich konstant. Deshalb ist die Höhe des Blutzuckers ein ausgezeichnetes Kriterium bei allen krankhaften Veränderungen des Zuckerstoffwechsels. Der Diabetiker ist besonders auf die Kontrolle des Blutzuckerspiegels angewiesen, abgesehen von anderen gleichzeitig auftretenden Symptomen, z. B. Azidose und Glucosurie. Letztere ist am Reduktionsvermögen des Harnes leicht zu erkennen, eventuell neben einer vermehrten Ammoniakausscheidung. Neben dem Nüchternwert ist die sogenannte Belastungskurve von Bedeutung, d. h. das Verhalten des Blutzuckers nach einer Belastung mit 50—100 g Dextrose. Beim Normalen soll der darauf folgende Blutzuckeranstieg nach etwa 1½ Stunden wieder zur Norm zurückgekehrt sein. Eine verminderte K.H.-Toleranz findet sich außer beim Diabetes mellitus noch bei Lebererkrankungen, Vergiftungen, Hyperthyreosen, Acidosis und Hyperpituitarismus. Eine gesteigerte K.H.-Toleranz wird bei Hypothyreoidismus, Morbus Addison, Ca des Pankreas und Hypopituitarismus gefunden. Hypoglykämien beobachtet man bei der Addisonischen Krankheit und nach Insulininjektionen, besonders bei empfindlichen Patienten.

Die Bestimmung des Blutzuckers gründet sich praktisch immer auf sein Reduktionsvermögen, was auf der Anwesenheit der Carbonylgruppe (Aldehyd) beruht. Unter den zahllosen Methoden ist zur Zeit die nach HAGEDORN-JENSEN als besonders einfach und zuverlässig erkannt worden. Sie beruht darauf, daß beim Kochen in *alkalischer* Lösung Ferricyankalium durch Zucker reduziert wird und daß sich der Überschuß an Ferricyankalium nach dem Ansäuern leicht jodometrisch erfassen läßt. Dabei ist zu betonen, daß bei der Oxydation des Zuckers (gleichzeitige Reduktion des  $K_3[Fe(CN)_6]$ ) keine genauen stöchiometrischen Verhältnisse vorliegen und die Resultate aus einer empirisch geeichten Tabelle abgelesen werden müssen. Auch sind die Resultate insofern ungenau, als im Blut noch andere reduzierende Stoffe vorkommen, deren Reduktionswert aber im Verhältnis zur wahren Glucose sehr gering ist und daß es deshalb berechtigt ist, die Werte nach der Methode von HAGEDORN-JENSEN wenigstens klinisch und diagnostisch, als wirkliche Zuckerwerte anzusprechen.

Die Bestimmung der Fructose und Galactose siehe im zweiten Band. Eine Schnellmethode beruht auf der Reduktion alkalischer Pikrinsäure zu Pikraminsäure, deren Färbung im Authenriethschen Colorimeter oder in dem ähnlichen Spezialgerät von Zeiss-Ikon gemessen wird (siehe später).

Die Arbeitsvorschrift ist folgende:

*Reagenzien* zur Bestimmung nach HAGEDORN-JENSEN.

A. Zum Enteiweißen.

1. 45 g kristallisiertes Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) p. a. werden ad 100 ccm in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und hieraus zum Gebrauch eine 0,45%-Lösung hergestellt (1 ccm ad 100).

2. 0,4% Natronlauge.

B. Zur Zuckerbestimmung.

1. 1,65 g Kaliumferricyanid ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) und 10,6 g geglähtes Natriumcarbonat werden auf 1 l gelöst und in brauner Flasche aufgehoben.

2. Zinksulfat-Kochsalz. 50 g Zinksulfat p. a. und 250 g NaCl p. a. ad 1000 ccm.

3. KJ-Lösung 12,5% in brauner Flasche mit einem Tropfen Quecksilber aufbewahren. Zum Gebrauch werden vier Teile Lösung 2 und ein Teil Lösung 3 kurz vor Gebrauch gemischt. Die Lösung darf auf Zusatz von Stärke nicht blau werden.

4. 3% Essigsäure (30 ccm Eisessig ad 1000 ccm).

5. 1% lösliche Stärke in gesättigter KCl-Lösung.

6.  $n/200$ -Thiosulfat (0,7 g Natriumthiosulfat in 500 ccm Wasser).

7. Jodatlösung  $n/200$ : 0,3566 g reinstes trockenes  $\text{KJO}_3$  (Kaliumjodat) auf 2000 ccm aufgefüllt im Meßkolben; gibt mit KJ + Säure genau  $n/200$ -Jodlösung zur Titerstellung des Thiosulfats.

*Ausführung.* In ein Reagensglas kommen 1 ccm 0,4% NaOH und 5 ccm 0,45%  $\text{ZnSO}_4$ , dazu aus einer feinen Blutzucker-Pipette 0,1 ccm frisches Blut, indem man die Pipette mehrmals mit der Lösung im Reagensglas ausspült. Das Ganze wird gut geschüttelt und 3 Minuten in einem siedenden Wasserbad gekocht, noch heiß in kleine Gläser ( $125 \times 30$  mm) filtriert, die sich in einem entsprechenden Blechgestell befinden. Reagensglas und Filter werden zweimal mit etwa 3 ccm warmen destilliertem Wasser nachgewaschen, der Trichter herausgenommen und kurz abgespritzt und das klare Filtrat-Waschwasser mit einer genauestens abgemessenen Menge von 2 ccm ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) versetzt (am besten ist eine Vollbürette) (Seite 45 III). Die Mischung kommt jetzt für 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad, man kann in einem Gestell bis zu 30 Proben gleichzeitig kochen, worunter sich stets *zwei Leerwerte* befinden, die kein Blut enthalten. Es werden auch immer vom Blut zwei Parallelproben entnommen, deren Ergebnis übereinstimmen muß. Nach dem Kochen kühlt man möglichst rasch ab und gibt 2 ccm Kaliumjodid-Zinksulfat-Kochsalz (Mischung aus Lösung 2 und 3, 1:4) dazu. (Der Zusatz von Zinksulfat ist wichtig, weil dadurch das gebildete Kaliumferrocyanid als

unlöslicher Niederschlag entfernt wird und nur so die jodometrische Bestimmung möglich ist.) Dann wird der Inhalt der Gläschen mit 2 ccm Essigsäure (Lösung 4) angesäuert, ein Tropfen Stärkelösung dazugegeben und mit der  $n_{/200}$ -Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung titriert, was trotz der Trübung gut zu erkennen ist. Die Titrationsergebnisse werden mit dem inzwischen festgestellten Titer multipliziert und das Ergebnis in mg-% aus der folgenden Tabelle entnommen, die *nur* bei Anwendung von 0,1 ccm Blut gilt.

ccm  $n_{/200}$ -Thiosulfat (reduziert) = mg-% (Glucose).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358	0,0
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333	0,1
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312	0,2
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292	0,3
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272	0,4
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253	0,5
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234	0,6
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215	0,7
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197	0,8
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179	0,9
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161	1,0
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143	1,1
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125	1,2
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108	1,3
1,4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90	1,4
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72	1,5
1,6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54	1,6
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36	1,7
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19	1,8
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2	1,9

*Beispiel:* Den Titer der Thiosulfatlösung bestimmt man, indem genau 2 ccm der  $n_{/200}$ -Jodatlösung mit 2 ccm Kaliumjodid-Zink-sulfat-Kochsalz (Mischung 2 und 3) und 2 ccm 3% Essigsäure versetzt werden und nach Zugabe von Stärke mit Thiosulfat bis farblos titriert werden.

*Beispiel:* Bei der Titerstellung werden verbraucht

1,867 ccm Thiosulfat

1,872 „ „

1,870 „ „

Mittel 1,870

$$\text{Titer} = \frac{2,000}{1,870} = 1,070.$$

Verbraucht Thiosulfat beim	Mittel	Glucose mg %	Glucose mg % nach Abzug des Leerwertes
Leerversuch a) 1,820 reduziert 1,947 b) 1,830 ( $\times 1,070$ ) 1,957	1,952	8	—
Probe 1 a) 1,375 „ 1,470 b) 1,368 „ 1,460	1,465	94	86
Probe 2 a) 0,600 „ 0,641 b) 0,593 „ 0,634	0,638	243	235

Mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Methode ist es leicht möglich, den Blutzucker bis auf  $\pm 5\%$  genau zu bestimmen und bei einiger Übung in der Blutentnahme *und* den praktischen Handgriffen, den Fehler auf  $\pm 2\%$  herabzudrücken. Die Methode leistet hervorragende Dienste bei den K.H.-Belastungsversuchen bei Diabetikern oder bei erhöhter K.H.-Toleranz.

**Blutzucker-Schnellmethode.** Es hat seine Berechtigung, neben der titrimetrischen Methode noch eine Schnellmethode zu beschreiben, die zur Diagnose zur Verfügung stehen soll und bei welcher keine große Genauigkeit verlangt wird. Das Prinzip dieser Methoden beruht fast immer auf der Reduktion von Pikrinsäure bei stark alkalischer Reaktion und in der Hitze. Fehlerquellen sind die gleichzeitige Reduktion durch andere Stoffe wie Kreatin und Aceton, die in wechselnder Menge vorhanden sind und die Resultate stören. Es wird deshalb die nachstehend beschriebene Methode nur zur Orientierung am Krankenbett oder in der Sprechstunde empfohlen, für eine klinische Beobachtung scheint sie nicht geeignet.

Die Methode ist von CRECELIUS-SEIFERT ausgearbeitet, den Apparat stellt Zeiss-Ikon, Berlin-Lichterfelde her. Der Apparat entspricht im Prinzip einem Keilcolorimeter (vgl. S. 24) der aber zu einer Spirale abgewandelt ist. Dadurch wird das Instrument handlicher. Die Ablesung in dem am meisten interessierenden Bereich von 70—150 mg-% Glucose ist genügend genau.

Auf eine Abbildung kann verzichtet werden, ebenso auf eine ausführliche Gebrauchsanweisung, die jedem Apparat beiliegt und in welcher auch die wesentlichsten Fehlerquellen behandelt werden.

*Methode.* Es werden 0,2 ccm Blut aus der Fingerbeere mit 1,8 ccm Wasser gemischt, die Pipette durch mehrmaliges Aufsaugen der Blut-Wassermischung ausgespült und 1 ccm einer

1,2% Lösung *reinsten* Pikrinsäure zugesetzt. Die Lösung soll frisch sein. Vom eiweißfreien gelben Filtrat, welches man am besten in graduierte Reagensgläser laufen läßt, nimmt man einen abgemessenen Teil z. B. 1,5 ccm und gibt 10% dieser Menge an 20%iger reiner Natronlauge zu. In diesem Falle 0,15 ccm, kocht im Wasserbad oder Dampfstrom *genau* 5 Minuten, kühlt rasch unter der Wasserleitung, ersetzt die verdampfte Flüssigkeit im Reagensglas und füllt in den rechteckigen Colorimetertrog, der zum Apparat gehört. Es wird spätestens nach 30' im Colorimeter verglichen, den Gehalt an Glucose liest man unmittelbar auf einer Skala im Gesichtsfeld ab, nachdem Probe und Keil auf gleiche Farbe eingestellt waren. Das Auge muß gut adaptiert sein und die Beleuchtung soll mittelhell und gleichmäßig von der Reflexion des Tageslichtes an einem weißen Bogen herrühren.

Die Skala gilt für 0,2 ccm Blutprobe. Wird nur 0,1 ccm entnommen, so sind die Werte zu verdoppeln und 1,9 ccm Wasser zu nehmen. Es empfiehlt sich die Reinheit der Reagenzien durch Leerproben zu kontrollieren.

*Harnzucker, Polarisation.* Der Polarisationsapparat ist weiter vorne schon beschrieben (S. 36). Die Bestimmung ist schnell und einfach und verdient vor allen anderen den Vorzug.

Der Harn wird mit einer Messerspitze neutralem Bleiacetat eine Zeitlang geschüttelt, am besten vorsichtshalber auch mit wenigen Tropfen Eisessig versetzt, weil er sauer reagieren muß, sollen durch die Behandlung mit Bleiacetat keine Verluste an Zucker entstehen. Das Filtrat soll klar und hell sein, es wird in die trockene Polarisationsröhre blasenfrei eingefüllt, indem das obere Deckglas von der Seite auf die vollständig gefüllte Röhre aufgesetzt wird. Die Deckgläser müssen trocken und sauber sein. Die Röhre wird in den Polarisationsapparat eingesetzt und an Kreisteilung und Nonius der Gehalt an Zucker abgelesen. Wichtig ist natürlich die Abwesenheit von Lävulose, die aber ohne exogene Zufuhr nicht vorkommt und die Abwesenheit von Eiweiß. Eventuell kann durch Linksdrehung die Anwesenheit wie auch die Konzentration von Lävulose nach Belastungsversuchen erkannt werden.

Über die Bedeutung des Harnzuckers soll nur soviel gesagt sein, daß neben der absoluten Konzentration die Tagesausscheidung wesentlich ist, um im Verhältnis zum zugeführten Kohlehydrat den verbrannten bzw. assimilierten Anteil feststellen zu können.

**Eiweiß im Harn.** Die heute noch übliche Schätzung der Eiweißkörper nach **ESBACH** ist mit erheblichen Fehlerquellen behaftet, erfüllt aber neben einem scharfen qualitativen Nachweis für die praktischen Bedürfnisse ihren Zweck. Die Methode ist denkbar einfach. In ein spezialgraduiertes Reagensglas (Abb. 28) kommt bis zur Marke U Harn und dann bis zur Marke R das Reagens, bestehend aus 10 g reiner Pikrinsäure und 20 g Citronensäure ad 1000 ccm, dann schüttelt man mehrmals um. Die Probe bleibt 24 Stunden bei Zimmertemperatur ruhig stehen. Nach dieser Zeit wird die Höhe des Bodensatzes an der eingravierten Skala abgelesen, woraus sich sofort der Eiweißgehalt in g<sup>0</sup>/<sub>100</sub> ergibt. Harn mit dem spezifischen Gewicht über 1,006 werden verdünnt, desgl. bei hohem Eiweißgehalt. Es ist wesentlich, daß der zum Versuch gelangende Harn sauer reagiert.



Abb. 28.  
Reagens-  
glas nach  
**ESBACH**  
zur Eiweiß-  
bestim-  
mung im  
Harn.

Den Gesamteiweißgehalt im Serum oder Plasma bestimmt man am schnellsten mit der Refraktion. Hierüber, sowie über die fraktionierte Bestimmung vgl. Bd. II.

**Cholesterin.** Die Bestimmung des Cholesterins im Serum hat gewisse diagnostische Bedeutung für Nephrosen. Bei Leberkranken ist der Wert des gesamten Cholesterins nicht charakteristisch, sondern nur das Verhältnis  $\frac{\text{freies Cholesterin}}{\text{Cholestrinester}}$ . Normalerweise soll dies sein 1:2 bis 1:3, während sich bei Leberkranken das Verhältnis umkehren kann, d. h. die Ester nehmen stark ab, auch wenn das gesamte Cholesterin nicht vermindert ist. Von Bedeutung ist ferner noch die Cholesterinämie beim Diabetes mellitus, wo Werte bis zu 2,8% vorkommen, bei Lipoidnephrosen, Arteriosklerose und in der Gravidität. Physiologisch kommen Werte von 100—200 mg-% Gesamtcholesterin im Serum vor, und davon 40—80 mg-% freies und 60—120 mg-% gebundenes Cholesterin (Ester).

Die Bestimmung des freien neben gebundenem Cholesterins ist nur möglich durch Digitoninfällung vor der Verseifung. Es folgt zuerst die Methode zur colorimetrischen Bestimmung des gesamten Cholesterins mit der Farbreaktion von **BERNOULLI** mittels Acetylchlorid. Die hiermit erzielten Werte sind wesentlich genauer als die colorimetrischen Werte durch die Reaktion mit Essigsäureanhydrid-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Autor (**GÖRTZ**, Biochem. Z. 1934, 273, 396) gibt die Fehlerbreite zu 2% an und betont außerdem, daß die

Farbe in der Kälte bis 24 Stunden unverändert ist. Dies ist praktisch von großer Bedeutung, besonders da die Bestimmung in 0,1 ccm Blut erfolgen kann.

*Reagenzien.* 1. Chloroform.

2. Acetylchlorid KAHLBAUM. In kleinen Ampullen oder Glasflaschen zu beziehen und möglichst gut verschlossen und kalt aufbewahren.

3. 20% Zinkchlorid *wasserfrei* in 320 g Eisessig bei 50–70° gelöst unter Ausschluß von Feuchtigkeit. 6–7 Wochen haltbar.

4. Bolus alba MERCK.

5. Cholesterinstammlösung 0,4<sup>0</sup>/<sub>00</sub> in Chloroform, aus welcher Kontroll- und Eichlösungen von 0,01–0,08<sup>0</sup>/<sub>00</sub> hergestellt werden.

6. NaOH purum in rotulis MERCK.

7. Digitoninlösung 1% in Alkohol.

*Apparate.* Jenaer Reagensgläser 150 · 15 mm mit Rand und genau passendem ganz glatten Korkstopfen. Filter extra dünn und schnell filtrierend. Korken und Filter werden im Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert.

Glasgefäße werden in Chromschwefelsäure gereinigt und mit Leitungswasser gespült. Das Acetylchlorid wird mit einer Pipette abgemessen, deren oberes Ende ein Natronkalkrohr mit Carbo medicinalis pulv. trägt.

Die Auswertung erfolgt am besten mit einem Absolutcolorimeter nach einer Eichkurve.

*Ausführung.* In die Reagensgläser kommen 1,5 ccm H<sub>2</sub>O und 0,1 ccm Serum, indem man die Pipette mehrmals ausspült. Dazu gibt man drei Plätzchen NaOH (etwa 0,4 g) und löst bei gelinder Wärme unter Schütteln. Nachdem Lösung eingetreten ist, wird 2½ Stunden im Wasserbad gekocht. Nach dem Erkalten wird 10ccm Chloroform zugegeben, mit einem numerierten und extrahierten glatten Korken verschlossen und energisch 1 Minute geschüttelt. Man kann bis zwei Proben auf einmal in Angriff nehmen, schüttelt sie der Reihe nach in Gruppen zu vier Stück 3 · 1 Minute. (Kontrolle mit Stoppuhr.) Dann kommen in vier Gläschen je etwa 1,2 g Bolus alba (sechs Spatel voll) und wieder wird 1 Minute geschüttelt, nachdem drei Tropfen Wasser zugesetzt sind. Hierbei soll das Chloroform kristallklar werden, was man an den Teilen des Glases erkennen kann, die durch den Korken vor dem Bolus alba-Beschlag geschützt waren (Korken herausdrehen). Je nachdem setzt man noch einen Tropfen Wasser oder etwas Bolus zu. Man filtriert in ein leeres Reagensglas (Filter mit Pinzette anfassen) pipettiert 5 ccm Filtrat in einen 10 ccm Meßkolben, gibt

1 ccm Eisessig  $ZnCl_2$  und 1 ccm Acetylchlorid dazu und erwärmt genau 10 Minuten im Wasserbad von  $70^\circ$ . Die Meßkolben sind mit extrahierten Korken verschlossen. Die Extraktion bis zum Pipettieren in die Meßkolben soll möglichst schnell erfolgen. Nach dem Erwärmen wird in kaltem Wasser abgekühlt, mit Chloroform bis zur Marke aufgefüllt und colorimetriert. Die fertigen Proben sollen nicht länger als 50 Minuten der normalen Temperatur ausgesetzt werden. Ein ständig zu verarbeitender Blindwert wird von dem Resultat abgezogen. Die Berechnung erfolgt in bekannter Weise nach einer Eichkurve.

Soll auch der Cholesterinester bestimmt werden, so verfährt man folgendermaßen<sup>1</sup>. 1 ccm Serum wird in einem Meßkolben von 25 ccm mit 15 ccm Alkohol-Äther 4:1 enteiweißt, 30 Sekunden im Wasserbad gekocht und nach dem Abkühlen auf 25 ccm aufgefüllt. Man filtriert durch ein dünnes Filter und 5 ccm Filtrat werden im Wasserbad fast zur Trockne gebracht, mit etwa 1,5 ccm Alkohol gelöst, 0,5 ccm Digitoninlösung zugegeben und wieder zur Trockne verdampft. Die Cholesterinester werden mit 10 ccm Chloroform ausgezogen, indem man dreimal mit 3,5 ccm ausschüttelt, filtriert, verdampft und der Rückstand mit 1,5 ccm  $H_2O$  und drei Plätzchen NaOH, wie oben angegeben, verseift usw.

Ein anderer Teil des Alkohol-Ätherfiltrates z. B. 2,5 ccm wird ebenfalls eingedampft, der Rückstand sofort verseift und wie oben weiter behandelt.

Es versteht sich, daß Doppelproben angesetzt werden, die alle aus 1 ccm Serum gewonnen werden.

5 ccm Filtrat für die Bestimmung der Ester entsprechen 0,2 ccm Serum.

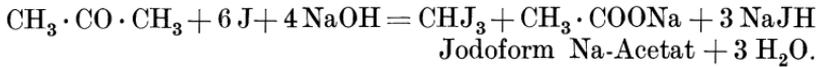
2 ccm Filtrat zur Bestimmung des Gesamtcholesterins entsprechen 0,1 ccm Serum.

Die Differenz beider Bestimmungen ergibt das freie Cholesterin.

**Bestimmung der Acetonkörper im Blut nach ENGFELD.** Im Harn genügt meistens der qualitative Nachweis der Acetonkörper, unter welchen man das Aceton selbst und Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure versteht. Es können bei schwerem Diabetes bis zu 150 g Acetonkörper in 24 Stunden ausgeschieden werden, weil die Fettsäuren vom Organismus nicht vollständig verbrannt werden, wenn gleichzeitig keine oder ungenügend K.H. verbrennen. Man findet normal 1—3 mg-% Gesamtacetonkörper im Blut; höhere Werte bei Hunger, Schwangerschaft und besonders beim Diabetes im Koma Werte bis zu 350 mg-%.

<sup>1</sup> RAPAPORT und ENGELBERG, Klin. Wschr. 1931, 700.

Besonders beim Coma diabeticum können große Mengen Ketonkörper retiniert werden, deren Bestimmung darauf beruht, daß Aceton leicht flüchtig ist und durch eine alkalische Jodlösung zu Jodoform und Natriumacetat oxydiert wird. Jedes Molekül Aceton verbraucht dabei 6 Atome Jod.



Das überschüssige Jod kann nach dem Ansäuern zurücktitriert werden. Die Acetessigsäure geht bereits in der Hitze in Aceton über durch Abspaltung von CO<sub>2</sub> und die β-Oxybuttersäure wird

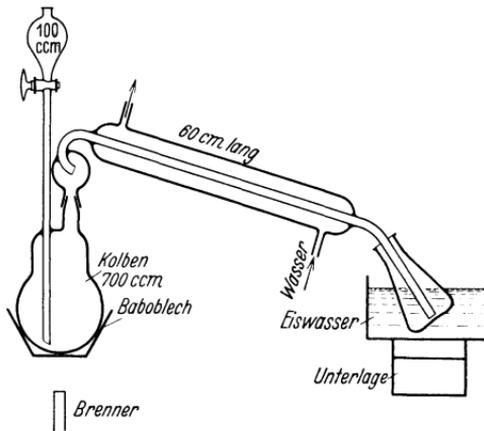


Abb. 29. Acetonbestimmung nach ENGFELD.

durch Chromsäure erst zu Acetessigsäure oxydiert und spaltet dann CO<sub>2</sub> ab.

*Apparatur.* Bei der Destillationsapparatur nachfolgender Zeichnung (Abb. 29) sind Schlauch und Gummistopfen zu vermeiden, da sie Fehlerquellen mit sich bringen.

*Reagenzien.* 1. 5% Ammoniak.

2. Gesättigte Bleiacetatlösung.

3. 1% Alaunlösung.

4. Verdünnte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%.

5. Chromschwefelsäure: 2 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> und 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure werden mit Wasser ad 100 ccm gelöst.

6. 20% Natronlauge reinst, alkoholfrei.

7. n/100-Jodlösung } Titer täglich bestimmen.

8. n/100-Thiosulfat }

1% Stärkelösung.

*Ausführung.* 2,5 ccm Oxalatblut werden im Meßkolben mit 5 ccm Ammoniaklösung versetzt, dann mit 150 ccm  $H_2O$  verdünnt und nacheinander 5 ccm Bleiessig und 10 ccm Alaun zugesetzt. Nach 30 Minuten wird auf 250 ccm aufgefüllt und klar filtriert, eventuell durch ein doppeltes Filter. 200 ccm klares Filtrat (eiweiß- und zuckerfrei!) kommen mit 100 ccm  $H_2O$  in den Destillierkolben, werden mit 2 ccm  $H_2SO_4$  angesäuert und mit Talk von einem Baboblech 10 Minuten destilliert. In der Vorlage befindet sich kaltes Wasser, sie wird von außen durch etwas Eiswasser gekühlt. Ist die erste Destillation beendet, so wird die Vorlage mit genau 10 ccm  $n/_{100}$ -Jodlösung<sup>1</sup> beschickt und mit Natronlauge (etwa 5 ccm) alkalisiert (Jodfarbe verschwindet). Zur zweiten Destillation wird durch den Tropftrichter langsam 50 ccm Chromschwefelsäure gegeben, dabei weiter 25 Minuten destilliert und das Destillat ebenfalls mit Jod und Natronlauge beschickt.

Haben die Vorlagen 10 Minuten gestanden, so wird mit 5–10 ccm  $H_2SO_4$  angesäuert und sofort mit  $n/_{100}$ -Thiosulfat titriert.

*Berechnung.* Der Titer von Jod und Thiosulfatlösung ist in jedem Falle zu berücksichtigen.

Das erste Destillat liefert Aceton aus dem präformierten Aceton und der Acetessigsäure. Jeder Kubikzentimeter Jod der verbraucht wurde, entspricht 0,1024 mg Gesamtaceton.

Im zweiten Destillat entspricht jeder verbrauchte Kubikzentimeter  $n/_{100}$ -Jod 0,25 mg Oxybuttersäure. Destilliert wurden 200 ccm Filtrat = 2 ccm Blut. — Beispiel:

Vorgelegt I . . . . .	10,00 ccm	Jodlösung $n/_{100}$
zurücktitriert . . . . .	7,80 „	Thiosulfat $n/_{100}$
verbraucht . . . . .	<u>2,20 ccm</u>	Jodlösung = 0,2255 mg in
2 ccm Blut = 11,275 mg-%.		Aceton + Acetessigsäure, als Aceton berechnet.

Vorgelegt II . . . . .	10,00 ccm	Jodlösung $n/_{100}$
zurücktitriert . . . . .	<u>5,31 ccm</u>	Thiosulfat $n/_{100}$
verbraucht . . . . .	4,69 ccm	Jodlösung = 1,171 mg in
2 ccm Blut = 58,55 mg-%.		Oxybuttersäure.

Die Menge Filtrat, die zur Destillation genommen wird, richtet sich nach der Konzentration der Acetonkörper. Bindende Zahlen sind nicht anzugeben. Die Methode ist ebenfalls für Harn anwendbar, entsprechend der größeren Konzentration sind die

<sup>1</sup> Die Jodmenge richtet sich nach der Acetonmenge.

Analysenmengen zu reduzieren, bzw. man kann mit  $n/_{10}$ -Jod und Thiosulfatlösung arbeiten.

*Diastase:* Die Menge der Diastase im Harn spielt unter zwei Bedingungen eine Rolle: Bei gewissen Erkrankungen der Pankreas (Pankreatitis und Pankreas Ca), wobei der Diastasegehalt im Urin erhöht ist und bei Nephritis, wo der Diastasegehalt infolge geringerer Durchlässigkeit der Niere vermindert ist. Dies kann bei getrennt aufgefangenem Harn sogar zur Erkennung der kranken Niere benutzt werden und aus dem Grad der Fermenterhöhung oder -verminderung läßt sich ein Rückschluß auf die Krankheit ziehen.

Der Normalharn des Menschen soll nach der Formulierung von  
 WOHLGEMUTH an Diastase enthalten  $D \begin{matrix} 38^0 \\ 24 \text{ Std.} \end{matrix} = \text{etwa } 156 \text{ im cm}^3$   
 oder  $d \begin{matrix} 38^0 \\ 30' \end{matrix} = \text{bis } 64 \text{ im cm}^3$

Diastaseeinheiten bei einer 24stündigen bzw.  $\frac{1}{2}$ stündigen Bestimmung im Thermostaten bei  $38^0 \text{ C}$ .

*Prinzip.* Man stellt eine Verdünnungsreihe des zu prüfenden Harnes mit physiologischer NaCl-Lösung her, versetzt diese Verdünnungen mit Phosphatpuffer  $p_H$  6,8 und der gleichen Menge Stärke. Nach 30' Aufenthalt bei  $38^0$  wird jedes Röhrchen mit Jod versetzt, und es entwickelt sich eine blaue Farbe nur dort, wo noch ungespaltene Stärke vorhanden ist. In den anderen Röhrchen ist alles zu Dextrinen, Maltose und Dextrose abgebaut.

Das Röhrchen, welches eben noch blaue Farbe zeigt, bezeichnet man mit „limes“ und nimmt das vorhergehende zur Berechnung, weil in diesem keine Stärke mehr vorhanden ist.

Die Verdünnungsreihe kann in beliebigen Intervallen hergestellt werden, wodurch sich die Genauigkeit der Methode ergibt.

*Reagenzien.* 1. Physiologische Kochsalzlösung.

2. Etwa  $n/_{50}$ -Jodlösung (2,54 g Jod + 6,6 KJ ad 1000).

3. Lösliche Stärke  $1^0/_{00}$  (1 g lösliche Stärke MERCK oder KAHLBAUM in 1 l Wasser auf dem Wasserbad hergestellt).

4. Phosphatpuffer  $p_H$  6,8 (je 50 ccm  $m/_{15}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $m_{15}$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

*Ausführung.* 12 Reagensgläser werden numeriert und das erste mit 2 ccm Harn beschickt, die folgenden mit je 1 ccm physiologischer NaCl-Lösung. Dann kommt aus Röhrchen 1  $1 \text{ cm}^3$  nach Röhrchen 2 und nach sorgfältigem Mischen davon

1 ccm nach 3 usw. Der 2. Kubikzentimeter Flüssigkeit aus Röhrrchen 12 wird verworfen. Die Röhrrchen enthalten jetzt 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,016, 0,008, 0,004, 0,002, 0,001 und 0,0005 ccm Harn. In jedes Röhrrchen kommt weiter 1 ccm Phosphatpuffer und 2 ccm  $1\frac{0}{100}$  Stärkelösung. Der Zusatz der Stärke muß entweder vollkommen gleichmäßig oder in regelmäßigen Abständen (30'') geschehen und die Reaktionsdauer im Thermostaten ( $38^{\circ}$ ) entsprechend eingerichtet werden. Nachdem jedes Röhrrchen 30 Minuten im Thermostaten war, wird es in Eiswasser gestellt und mit zwei Tropfen etwa  $n\frac{1}{50}$ -Jodlösung versetzt. Blaufärbung zeigt unverdaute Stärke an; ist alle Stärke verdaut, so ist die Farbe rotblau (Erythroextrin), Achroodextrin und Zucker geben einen schwach gelblichen Ton. Das erste blaue oder violette Röhrrchen ist „limes“, das vorhergehende dient zur Berechnung, indem ausgerechnet wird, wieviel ccm-Stärke von  $1\frac{0}{100}$  1 cm<sup>3</sup> Harn in 30 Minuten bei  $38^{\circ}$  abbauen kann.

*Berechnung.* Zum Beispiel blau ist noch das 7. Röhrrchen. Das 6. enthält 0,031 ccm Harne, die 1 ccm  $1\frac{0}{100}$  Stärke abbauen: demnach kann 1 ccm Harn unter denselben Bedingungen  $\frac{1,00 \cdot 1}{0,031}$  ccm Stärke abbauen = 32,2 d. h.  $d\frac{38^{\circ}}{30'} = 32,2$ ; ein unternormaler Wert.

Statt das Röhrrchen vor dem ersten blauen zu nehmen, kann man auch das letzte blaurote nehmen: Zum Beispiel blaurot ist Röhrrchen 10, dann ist  $d\frac{38^{\circ}}{30'} = \frac{1}{0,002} = 500$ .

Gibt man in jedes Röhrrchen 2 ccm physiologische NaCl-Lösung und gibt 1 ccm Harn dazu und pipettiert wieder 1 ccm ab, so ist die Verdünnungsreihe folgende:

Röhrrchen	.....	1	2	3	4	5	6	usw.
Harn ccm	.....	1	0,333	0,100	0,033	0,010	0,003	
oder wenn man 2 ccm Harn zu 1 ccm NaCl gibt.								
Harn ccm	.....	1	0,666	0,444	0,296	0,1975	0,1315	usw.

Man kann also die Konzentrationsstufen je nach der geforderten Genauigkeit beliebig variieren.

Die Methode läßt sich ebenso für einen 24 Stunden dauernden Versuch verwenden, indem 1% Stärke benutzt wird und in analoger Weise auch zur Bestimmung der Diastase im Speichel, Faeces und Duodenalsaft. Die Werte in Diastaseeinheiten sind dann anzugeben als  $D\frac{38^{\circ}}{24 \text{ Std.}} =$

Tabelle der normalen organischen Bestandteile.

	in 100 ccm		Harnausscheidung pro die
	Blut	Serum oder Plasma	
Hämoglobin .....	16 g	—	—
Rest N .....	—	25—40 mg	—
Harnstoff .....	—	30—50 mg	25—30 g
Harnsäure .....	—	2—4 mg	0,7 g
Bilirubin.....	—	0,2—0,8 mg	—
Indikan.....	—	0,1 mg	—
Ammoniak.....	0,02—0,04 mg		0,7 g
Aminosäure N <sub>2</sub> ..	5—8 mg		1% des ges. N <sub>2</sub>
Kreatin .....	3—6 mg		
Kreatinin.....			1,5 g
Blutzucker.....	80—120	—	—
Milchsäure.....	10	—	—
Cholesterin ges. ....	—	150—200 mg	—
„ freies ...	—	60 mg	—
„ Ester...	—	140 mg	—
ges. Fette .....	—	0,5—0,7 g	—
Acetonkörper .....	—	2 mg	—
Eiweiß.....	—	6—8 g	—
Albumin .....	—	5 g	—
Globulin .....	—	2—3 g	—
Fibrinogen .....	—	0,2—0,4 g	—

Harn: Gesamttagesmenge fester Stoffe 55—70 g. Gesamtkonzentration im Harn etwa 4%, davon NaCl etwa 1%, Harnstoff etwa 2%.

## Sachverzeichnis.

- Absolutcolorimetrie 26.  
Acetonkörper 86.  
Alkalireserve 58.  
Ammoniak im Harn 56.  
Analysator 28.  
Anorganische Bestandteile 49.  
— — Tabelle 64.
- Beersches Gesetz 22.  
Bilirubin 77.  
Blutentnahme 46.  
Blutzucker 79.  
Blutzuckerschnellmethode 82.
- Calciumbestimmung 49.  
Chloride im Blut 53.  
— — Magensaft 52.  
— nach Geyer und Rotsch 55.  
Cholesterin 84.  
Colorimeter nach Authenrieth 24.  
Colorimetrie 20.  
Colorimetrisches Prinzip 22.
- Destillationsapparatur 68.  
Diastase 89.  
Differenzwägung 1.  
Dissoziationsgrade 10.  
Doppelkeil zum Colorimeter 25.
- Eiweiß im Harn 84.  
Eiweißfällung 47.  
Eiweißfällungsmittel 48.  
Eichkurven 31 ff.  
Elektrisches Photometer 35.  
Empfindlichkeit der Waage 2.  
Enteiweißen 47.
- Fluorid (Gerinnung) 46.  
Franksche Nadel 46.
- Gasanalyse 41.  
Gasreduktionstabelle 43.  
Germanin 46.
- Gesamtchloride 52.  
Gesamtstickstoff 71.  
Glassachen reinigen 44.
- Hämoglobin 64.  
Hämolyse 47.  
Halbschattenapparate 37.  
Harnsäure im Blut 75.  
— — Harn 76.  
Harnstoff 73.  
Harnzucker 83.  
Hirudin 46.
- Indikatoren 14.  
Indikatorenenumwandlungspunkte 15.
- Jodat-Titration 13.
- Kaliumpermanganat 8.  
Kompensationscolorimetrie 23.  
Kompensator 40.
- Leifo 29.
- Magensaft 50.  
Mikrobüretten 45.  
Mischindikatoren 16.
- Natriumcarbonat zur Titerstellung 10.  
Nephelometrie 33.  
Niederschläge, analytische 5.  
Nonius 38.  
Normallösungen 6.  
— Übersicht 9.  
Novirudin 46.  
Nullpunkt 1.
- Organische Bestandteile 91.  
Oxalat (Gerinnung) 46.  
Oxalsäure 6.

- |   |  |
|---|--|
| <p>Polaphot 28.<br/> Polarisation 83.<br/> Polarisationsapparat 36.</p> <p>Reaktionsgleichungen zur Titration 10.<br/> Reduktionstabellen zur Alkalireserve 62.<br/> Refraktometer 39.<br/> Reststickstoff 65.<br/> Reststickstoffberechnung 71.<br/> Ruhepunkt 1.</p> <p>Schichthöhe 21.<br/> Schliffe, fetten 44.<br/> Spezifisches Gewicht von Säuren und Basen 11.<br/> Stufo 26.</p> | <p>Titer 7.<br/> Titrimetrische Fällungsreaktionen 13.<br/> Torsionswaage 4.<br/> Trübungsmesser 34.</p> <p>Vakuumapparatur 57, 69.<br/> Veraschungsgestell 67.<br/> Veraschungskolben 70.<br/> Verdünnen von Lösungen 12.</p> <p>Waage, analytische 1.<br/> Wasserdampfkorrektur 42.<br/> Wollaston, Prisma 28.</p> <p>Xanthoproteinreaktion 72.<br/> Zentrifuge 6.</p> |
|---|--|
-