

Quantitative Indicanbestimmung im Harne mit dem Meislingschen Kolorimeter.

Von

H. P. T. Oerum.

(Aus dem Laboratorium des Kgl. Friedrichs-Krankenhauses in Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Juli 1905.)

Quantitative Bestimmungen des Harnindicans stoßen insofern auf Schwierigkeiten, als wir zur Zeit keine Methode zu seiner exakten Bestimmung besitzen: man kann es titrimetrisch nach Wang-Obermayer¹⁾ oder nach Bouma²⁾ durch Überführung in Indigorot messen. So lange es noch unentschieden war, ob man nur das Indigoblau oder die gesamte Indigomenge bestimmen sollte, war die Entscheidung über die Verwendbarkeit der Methode zunächst eine Prinzipienfrage. Nachdem aber Maillard³⁾ sich der Boumaschen Auffassung angeschlossen hat, daß die roten, durch Oxydation des Indoxyls auftretenden Farbstoffs so gut wie das Indigoblau zur Indigogruppe gezählt werden müssen, und Ellinger⁴⁾ ebenfalls dieser Ansicht beigetreten ist, muß man notwendigerweise die Indigorotmethode wählen.

Nun können aber Indicanbestimmungen, die klinisch von großer Bedeutung sind, in der Praxis nicht mit so umständlichen Titrierungsmethoden vorgenommen werden; man hat deshalb nach einfacheren kolorimetrischen Verfahren gesucht.

Salkowski⁵⁾ hat zuerst den Indigo kolorimetrisch bestimmt, indem er ihn mit Chloroform ausschüttelte und die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 406; Bd. XXVI, S. 427; Bd. XXVII, S. 135.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82.

³⁾ Comptes rendus, Bd. CXXXII, S. 990.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 178.

⁵⁾ Virchows Archiv, Bd. LXVIII.

Farbe der Chloroformlösung mit der Farbe bekannter Lösungen verglich.

Ferner gab Strauß¹⁾ einen kleinen Apparat zur kolorimetrischen Bestimmung an. Der Harn wird mit Bleizucker gefällt und das Filtrat in einem graduierten Schütteltrichter mit einem gleichen Volumen des Obermayerschen Reagens und mit einer gemessenen Chloroformmenge geschüttelt. Man verdünnt dann die Chloroformlösung, bis ihre Farbe gleich der einer Vergleichslösung reinen Indigoblaues wird.

Diese Methode ist so genau wie etwa die klinische Hämoglobinbestimmung und hängt in sehr hohem Grade ab von der Dauerhaftigkeit der Vergleichslösung. Ferner ist hierbei zu bemerken, daß die ausgeschüttelte Menge immer Indigorot enthält und nicht reinblau wie die Vergleichslösung ist. Dieser Übelstand tritt jedoch wenig hervor, da die Vergleichslösung sehr verdünnt gewählt ist.

Bouma²⁾ schlug vor, mit einer Lösung von Isatin in Salzsäure Indoxyl zu Indigorot zu kondensieren, eine Methode, die von Beyerinck zum Nachweise von Indikan in Pflanzenzellen benutzt war. Der Chloroformauszug einer solchen Lösung wird mit Vergleichslösungen verschiedenen Gehaltes verglichen. Auf den Röhren ist nicht der wirkliche Gehalt angegeben, sondern nur die Hälfte, da bei dieser Methode die doppelte Menge Indigo gebildet wird — 1 Molekül Indoxyl gibt mit 1 Molekül Isatin 1 Molekül Indigo — während sonst der Indigo aus 2 Molekülen Indoxyl entsteht.

Die Bestimmung wird so ausgeführt:

20 ccm Harn werden mit $\frac{1}{10}$ -Volumen Bleiessig gefällt und durch ein trockenes Filter filtriert. Vom klaren Filtrat gießt man $5\frac{1}{2}$ ccm = 5 ccm Harn in ein Proberöhrchen und fügt 10 ccm einer Lösung von 20 mg Isatin in 1 l starker Salzsäure hinzu. Man erhitzt zum Sieden, kocht einige Sekunden, kühlt ab und schüttelt mit 5 ccm Chloroform gut durch. Jetzt macht die kolorimetrische Bestimmung keine Schwierigkeit. Die Vergleichsröhrchen sind im Dunkeln aufzubewahren und das Reagens ist jeden Monat frisch zu bereiten.

Die Resultate dieser Methode waren:

¹⁾ Deutsche medizinische Wochenschrift, 1902, Nr. 16.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 82.

	Titrimetrisch	Kolorimetrisch
Ellinger:	I. 14 mg	Zwischen 10 und 15 mg
	II. 11 »	10—15 »
	III. 32 »	30 »
	IV. 5 »	Unter 5 »
Bouma:	I. 7.6 »	Zwischen 5 und 10 »
	II. 33.0 »	30—40 »
	III. 32.5 »	Etwas über 30 »
	IV. 17.6 »	Zwischen 15 und 20 »

Zuweilen wird die Farbe violett oder blau statt rot, doch kann man nach Bouma¹⁾ diesem Übelstande durch Behandlung des Filtrates mit Schwefelwasserstoff abhelfen.

Diese Boumasche Methode ist sehr elegant und scheint nach Bouma bessere quantitative Verhältnisse als die direkte Bestimmung der Gesamtindigofarbstoffe bei der Wang-Obermayer-Boumaschen Methode zu geben. So liefert die Indigo-rotmethode 96,4⁰/₀, die andere Titriermethode 86,8⁰/₀. Diese letzteren sind aber recht umständlich, da man einige Stoffe, die in das Chloroform übergehen und störend auf die Titration mit Chamäleon wirken, entfernen muß.

Es muß also von großem Vorteil sein, wenn man kolorimetrisch dieselbe Genauigkeit wie titrimetrisch erreichen könnte; aber mit Vergleichsröhrchen wird man dann nicht arbeiten dürfen, selbst wenn man eine große Reihe mit nur je 5 mg Unterschied besäße, da die Farbe keineswegs dauerhaft und daher sehr unzuverlässig ist.

Das Zweckmäßigste ist deshalb die Verwendung einer völlig konstanten Probestoffe. Ist man im Besitze einer solchen, so wird man den titrieranalytischen völlig entsprechende Resultate erzielen können, sogar ohne Entfernung der reduzierenden Stoffe, also bedeutend schneller. Der einzige Mangel einer solchen Methode ist ein möglicher Übergang anderer färbender Bestandteile in das Chloroform.

Bei der Verwendung von Indigoblau als Bestimmungsobjekt entsteht die Schwierigkeit, daß die Farbe bei den im Harn auftretenden Mengen nicht intensiv genug wird, und zugleich wird das unvermeidlich gebildete Indigorot in hohem

¹⁾ Deutsche medizinische Wochenschrift, 1902, Nr. 39.

Grade die Beurteilung stören, wenn man mit leidlich konzentrierten Lösungen arbeitet. Daß man aber trotz der angeführten Schwierigkeiten eine Bestimmung von Indigoblau erreichen kann, haben viele Versuche gezeigt, doch ist die Methode zu wenig wissenschaftlich gestützt, um hier erwähnt zu werden.

In der Isatinmethode dagegen hat man eine Möglichkeit, die Aufgabe kolorimetrisch auf eine wissenschaftlich befriedigende Weise zu lösen: die Färbekraft ist größer und die Farbe völlig rein.

Das benutzte Kolorimeter war das Meislingsche Kolorimeter, wegen dessen näherer Einrichtung ich auf die Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XLIII, S. 138 verweise. Dieses Kolorimeter scheint mir bedeutende Vorteile vor den sonst angewandten, z. B. dem von Wolff, zu haben und ich bin nach zweijährigem täglichen Gebrauch damit völlig zufrieden. Außer zu Hämoglobinbestimmungen, zu denen er meistens in der Klinik verwendet wird, habe ich ihn zu Eisenbestimmungen im Blute,¹⁾ Kupferbestimmungen²⁾ und Jodbestimmungen benutzt. Die Farbe ist absolut dauerhaft und fordert zum Vergleiche keine Probelösung, die jedesmal beim Gebrauche anderer Kolorimeter analysiert werden muß, und schließlich fordert der Apparat nur 1 ccm zur Analyse.

Der Apparat verfügt über alle Spektralfarben + Purpur, keineswegs aber über alle Nuancen. Zur Bestimmung von Indigorot finden sich nun verschiedene Nuancen im Apparate, während dies für Indigoblau nicht der Fall ist.

Den besten Beweis dafür, daß eine Farbe wirklich der Farbe der Lösung entspricht, erhält man, wenn mehrere Reihen von Ablesungen dieselben Durchschnittszahlen für die Schichtdicke geben. Ich führe hier das Resultat von 3 Reihen von je 10 Ablesungen an:

6,54

6,53

6,59

deren Durchschnittszahl 6,55 ist. Dieser Fehler ist sehr gering, da der Apparat nicht Ablesung der Schichtdicke auf mehr als

¹⁾ Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XLIII, S. 147.

²⁾ Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. LXIII, S. 356.

eine Dezimale erlaubt. Da geringe Schichtdicke in der Regel die besten Resultate ergibt, führe ich an:

10,69	10,74	10,71
-------	-------	-------

deren Durchschnitt 10,71 ist.

Dieselbe Genauigkeit habe ich wie andere Untersucher immer innerhalb der Schichtdicke 5—15 gefunden.

Als Probefarbe habe ich nun 3 verschiedene gewählt, um immer dieselbe Genauigkeit zu erhalten, und zwar nahm ich in meinem Apparate 198,8°, 210° und 216,8°, da diese Schichtdicken ergaben, die sich wie 2 : 3 : 4 verhielten.

Da der Apparat keinen festen Nullpunkt hat, gibt man am besten die Farbe an und zwar als Abstand von der Hämoglobinfarbe, die in meinem Apparate bis 210° war.

Der Abstand wird dann 11,2°, 0° und 6,8°.

Eine sehr wichtige Aufgabe ist die Kalibrierung, die ich mit einer Lösung von Indigorot¹⁾ in Chloroform ausgeführt habe. Der Gehalt der Lösung mußte durch Abdampfen des Chloroforms festgestellt werden, da die gewogene und getrocknete Menge Indigorot nicht völlig in Chloroform löslich war.

Es fand sich in 1 l Chloroform 0,0087 g Indigorot, gewogen mit ca. $\frac{1}{10}$ mg Genauigkeit.

Diese Lösung gab nun folgende Schichtdicke bei den verschiedenen Farben:

216,8°	210°	198,8°
25,22	18,89	12,77

Diese Zahlen sind bei 20 Ablesungen in 2 Reihen mit je 10 Ablesungen und Aufgießen für jede Reihe erhalten.

Die 10 Ablesungen gaben folgende Durchschnittszahlen:

216,8°	210°	198,8°
25,03	18,97	12,78
25,41	18,81	12,77

Um den Gehalt an Indigorot berechnen zu können, hat man nur noch eine Konstante nötig, die folgende ist:

Für	216,8°	210°	198,8°
	219414	164343	110099

¹⁾ Für die Überlassung des benutzten Präparates sage ich hiermit der Badischen Anilin- und Sodafabrik meinen besten Dank.

Die Konstante ergibt sich sehr einfach durch Multiplikation der Schichtdicke mit 0,0087. Durch Division der Schichtdicke in dieser Konstante erhält man dann den Gehalt an Indigorot.

Zur Prüfung der Konstanten nahm ich eine stärkere Lösung unbekanntes Gehaltes. Sie ergab folgende Schichtdicke:

	216,8°	210°	198,8°	
	12,04	9,14	6,05	
	12,06	—	—	
Indigorot in mg	18,21	17,99	18,19	Durchschnitt 18,13.

Die Analyse ergab 18,1 mg Indigorot.

Der Unterschied im Befunde bei den einzelnen Nuancen war also in diesem Falle 0,2 mg und die Mittelzahl zeigte keine Abweichung von der durch Abdampfen erhaltenen Zahl, bei den einzelnen Nuancen dagegen nur 0,1 mg Differenz.

Die Abweichung in der Ablesung beträgt nur 1,1%, während die größte Abweichung von dem wirklichen Gehalte nur 0,7% ist.

Wenn nun die Probelösung ungenau wäre, z. B. 8,6 oder 8,8 mg statt 8,7 enthielte, so würde ein Fehler von 1,2% entstehen. Der gesamte Fehler würde dann 2,3% werden, oder man könnte auf diese Weise im ungünstigsten Falle 97,7% des vorhandenen Indigorotes finden, während die Titrierung nur einen Gehalt von 96,4% ergab.

Die Methode kann also mit der Titrierung an Genauigkeit konkurrieren und ist ihr an Schnelligkeit weit überlegen. Was die Umsetzung mit Isatin betrifft, so will ich nur bemerken, daß sie leicht vor sich geht und daß die wenigen Fälle, wo die Farbe einen bläulichen Ton hat, leicht durch Verwendung von Schwefelwasserstoff brauchbar gemacht werden können.

Anfangs benutzte ich ein weniger reines Isatin, das keine glatte Umsetzung hervorrief; seitdem ich Isatin Merck gebrauche, habe ich keine Schwierigkeiten mehr gehabt.

Man sieht leicht ein, daß man bei Verwendung der stärksten Farbe 216,8° nicht mehr wie 40 mg bestimmen kann, da die niedrigste Schichtdicke 5 ist, solange man das Verhältnis 5 Teile Harn zu 5 Teilen Chloroform beibehält. Bei größeren Mengen wird man also vorteilhaft die doppelte Menge

Chloroform nehmen. Das Verfahren ist sonst das von Bouma angegebene.

Zum Schluß ein paar Beispiele:

216,8°	198,8°
7,6	6,1
7,7	6,3
7,6	5,9
7,8	5,9
7,8	6,1
7,9	5,7
7,4	5,7
7,5	5,8
7,6	5,9
7,8	6,1
<u>7,7</u>	<u>5,95</u>
F: 28,5 mg	F: 18,5 mg

Der Gehalt dieser Harne ist dann 14,25 mg und 9,25 mg Indican in 1000 ccm. Ein diabetischer Harn (Tagesmenge 4380) gab 17,23 bei 210° = 6,4 mg oder für den Tag 27,9 mg Indigorot = 13,95 mg Indican, was der normalen Menge, die zwischen 10—15 mg Indican liegt, entspricht.