

Die Harnstoffbestimmung im Harn mit Natriumhypobromit.

Von

Marie Krogh, cand. med. et chir.

Mit einer Abbildung im Text.

(Aus dem zoophysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. März 1913.)

Die Zersetzung des Harnstoffes durch Bromlauge und die Messung der frei gewordenen Stickstoffmenge ist zuerst von Knop¹⁾ zur quantitativen Harnstoffbestimmung im Harn benutzt worden. Die Methode wurde bald darauf von Hüfner²⁾ modifiziert und von ihm und seinen Schülern weiter ausgearbeitet. Man fand, daß sowohl Harnstoff als auch Ammoniak bei Behandlung mit Bromnatron Stickstoff entwickelten, fand aber zugleich auch, daß die entwickelte Stickstoffmenge nicht ganz der berechneten entsprach, sondern nur ungefähr 95,4% derselben betrug. Hüfner³⁾ führte deswegen eine entsprechende Korrektur ein.

Später sind viele verschiedene Apparate angewendet worden, und die Methode wurde mehrmals geändert, so von Yvon, Esbach, Henri Moreigne⁴⁾ u. a.

Lange betrachtete man die Bromnatronmethode als ebenso genau wie andere Methoden zur Harnstoffbestimmung im Harn, und sie besaß den Vorteil, daß sie sehr leicht und schnell auszuführen war. Aber allmählich sind immer mehr Bedenken in bezug auf die Brauchbarkeit der Methode aufgetaucht, namentlich nachdem Mörner⁵⁾ sie eingehender zum Gegenstand

¹⁾ Berichte der Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch., 1870, S. 11

²⁾ Journ. f. pr. Chem., Bd. 3, 1871, S. 1.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 1, S. 350.

⁴⁾ Über Apparate siehe Moreigne. Thèse p. le Doct. en Méd. 1895, S. 135 u. a.

⁵⁾ Skand. Archiv f. Physiol., Bd. 14, S. 321.

der Kritik gemacht und Versuche zum Vergleich zwischen der Bromnatronmethode nach Hüfner mit der Mörner-Sjöquistischen Methode mit Zersetzung nach Folin angestellt hat. Mörner fand, daß die Harnstoffmenge nach der ersten Methode größer war als nach der letzteren, von 9% bis 418% größer. Von der Voraussetzung ausgehend, daß die Mörner-Sjöquist-Folinsche Methode die richtige Harnstoffzahl gibt, müßte folglich die Bromnatronmethode als unbrauchbar angesehen werden.

Die wesentlichsten der Einwände, die gegen die Bromnatronmethode zur Bestimmung von Harnstoff im Harn erhoben worden sind, waren folgende:

1. Daß der Harnstoff und die Ammoniaksalze nicht gleich leicht zerlegt werden. Mörner¹⁾ fand, daß Ammoniak leichter zerlegt wird als Harnstoff, und ist daher im Gegensatz zu Camerer²⁾ und Huppert²⁾ der Ansicht, daß die Ammoniakkorrektur geringer werden muß als die Hüfnersche Korrektur.

2. Daß außer Ammoniak und Harnstoff auch noch andere von den stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns mit Bromnatron reagieren. So hat man gefunden, daß Harnsäure bis 47,8%,²⁾ Kreatin ca. 66%,²⁾ Kreatinin 37,4—60%,²⁾ Allantoin 25—50% und Oxyproteinsäure ca. 20%²⁾ von ihrem Stickstoff abgaben. Auch genuine Proteinstoffe sollten Stickstoff abgeben.

3. Daß die Zeit, die die Reaktion währte, eine Rolle spielte, indem einige Bestandteile bei längerer Einwirkung weniger Stickstoff abgeben sollten, andere mehr.

4. Daß die Menge des frei gewordenen Stickstoffes ferner von der Zusammensetzung des Reagens abhängig war. So fanden Schenck, Pflüger, Falk und Arnold,³⁾ daß, je alkalischer das Bromnatron war, desto mehr Stickstoff frei wurde. Quinquaud⁴⁾ fand, daß, wenn er zwei gleich großen Volumina von Natriumhydroxyd ungleich große Brommengen zusetzte,

¹⁾ Skand. Archiv f. Physiol., Bd. 14, S. 326.

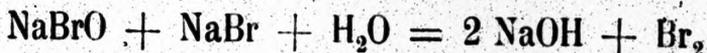
²⁾ Zit. nach Mörner, *ibid.*, S. 322.

³⁾ Zit. bei Moreigne, Thèse p. le Doct. en Médecine, 1895, S. 123.

⁴⁾ Zit. nach Hamburger, Zeitschrift f. Biol., Bd. 20, S. 303.

die Luftmenge am größten bei dem Reagens wurde, das am wenigsten Brom enthielt. Außerdem fand er, daß, wenn das Reagens mit Wasser verdünnt wurde, die frei gewordene Luftmenge geringer war. Duggan¹⁾ fand eine Luftmenge, die ungefähr 99% des im Harnstoff enthaltenen Stickstoffes entsprach, indem er dem Harnstoff erst konzentriertes Natriumhydroxyd und dann nach und nach Brom zusetzte.

Auf Grundlage der zuletzt angeführten Ergebnisse hat Hamburger²⁾ eine Hypothese aufgestellt. Er sagt: «Meine Meinung geht dahin, daß nach der Vermischung von Natronhydrat, Wasser und Brom bei einer bestimmten Temperatur ein gewisses Gleichgewicht besteht zwischen NaBrO, NaBrH, H₂O und freiem Brom, daß bei Verdünnung einer Bromlauge mit Wasser der ursprüngliche Gleichgewichtszustand aufgehoben wird, und ein neuer sich bildet, sobald das freie Natronhydrat wieder die vorige Konzentration erreicht hat; was auf keine andere Weise geschehen kann als dadurch, daß eine Reaktion stattfindet, entgegengesetzt der, bei welcher NaOBr entstand, nämlich:



mit andern Worten: Das freie Brom wirkt nicht mehr ein auf eine Natronhydratlösung, wenn diese bis auf eine gewisse Konzentration herab gesunken ist.»

Hamburger sagt ferner über die Tatsache, daß man nicht die ganze theoretische Stickstoffmenge erhält: «Dies kann uns nicht wundern, wenn wir bemerken, daß das freie Brom der Bromlauge einen Teil des hinzugesetzten Harnstoffs an sich zieht, ohne daß daraus Stickstoff frei wird.»

5. Daß die Harnstoffkonzentration das Ergebnis beeinflussen könne. So fand Moreigne,³⁾ daß man bei einer größeren Harnstoffkonzentration eine verhältnismäßig geringere Luftmenge erhielt, und meint, daß man nicht mit Harnstofflösungen arbeiten sollte, die stärker sind als 1%.

¹⁾ Zit. nach Hamburger, Zeitschrift f. Biol., Bd. 20, S. 303.

²⁾ Zeitschrift f. Biol., Bd. 20, S. 302.

³⁾ Thèse p. le Doct. en Médecine, 1895, S. 154.

6. Daß ein Zusatz von Traubenzucker auf den Dekompositionsprozeß wirkt. Mehu¹⁾ und Moreigne²⁾ fanden, daß ein Zusatz von Traubenzucker bewirkt, daß Harnstoff bei Dekomposition mit Bromnatron fast seine ganze Stickstoffmenge abgibt. Moreigne fand ferner, daß dasselbe auch für Ammoniaksalze galt. Während dahingegen Lauritzen³⁾ und Schiödte⁴⁾ fanden, daß Traubenzucker keinen Einfluß auf die Menge des entwickelten Stickstoffes hatte.

7. Daß die Temperatur, bei der die Dekomposition vor sich geht, das Ergebnis beeinflussen könne.

Um nun zu sehen, inwiefern diese Einwände berechtigt sind, habe ich einige Untersuchungen mit Harnstoff und Ammoniumchloridlösungen und mit Lösungen einzelner anderer von den stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns und von Harn selbst vorgenommen.

Der Anlaß, diese Untersuchungen aufzunehmen, war, daß ich früher zusammen mit meinem Mann eine Reihe Stoffwechseluntersuchungen an Eskimoen⁵⁾ gemacht habe. Die Zeit und die primitiven Laboratorienverhältnisse in Grönland gestatteten uns nicht, Kjeldahl-Analysen an Ort und Stelle zu machen, weswegen ich zur Orientierung über den Stickstoffumsatz während der Versuche Harnstoffbestimmungen an den Harnproben mit Bromnatron nach Esbachs Methode⁶⁾ vornahm.

Die Harnproben stammten von Versuchsindividuen, die einige Tage besonders stickstoffreiche Kost und andere Tage relativ stickstoffarme Kost erhalten hatten. Als dann später

¹⁾ Compt. rend. I. Bd. 89, S. 175, 486.

²⁾ I. c., S. 150—153.

³⁾ Kl. Unders over Diab. mell. Doktordisp., 1897, S. 27, Kopenhagen.

⁴⁾ Unders. over Stofsk. ved Mb. Basedow. Doktordisp. 1899, S. 257, Kopenhagen.

⁵⁾ August Krogh and Marie Krogh, A study of the diet and metabolism of Eskimos, Meddelse om Grönland, Vol. 51. Kopenhagen.

⁶⁾ Doch mit der Änderung, daß ich, statt die Esbachschen Tabellen und Baroskop zu benutzen, das oft unzuverlässig ist und eine gleichartige Temperatur des Raumes erfordert, die Temperatur im Wasserbad und Barometerstand ablas und die abgelesenen Volumina auf 0°, 760 mm Hg-Druck und Trockenheit reduzierte.

Kjeldahl-Analysen von denselben Harnproben gemacht wurden, zeigte sich eine ziemlich gute Übereinstimmung zwischen den Kjeldahl- und den Esbach-Zahlen; die Esbach-Zahlen waren auf alle Fälle niedriger als die Kjeldahl-Zahlen. Das Verhältnis zwischen den Kjeldahl- und den Esbach-Zahlen war fast konstant, jedoch so, daß es an den Tagen geringer war, wo das Individuum stickstoffreiche Kost erhielt, als an den Tagen, wo es stickstoffarme Kost erhielt.

Da, wie erwähnt, die Fehlerquellen bei der Bromnatronmethode im ganzen für bedeutend gehalten werden, so begann ich damit, die Genauigkeit der Esbachschen Methode zu prüfen, um zu sehen, welchen Wert man den Esbach-Zahlen beimessen kann, und dabei wurde ich auf die folgende Untersuchungsreihe hingeführt.

Es stellte sich nämlich heraus, daß, wenn auch Esbachs Methode zu gewissen Zwecken anwendbar ist, sie doch nicht brauchbar ist, wo man größere Genauigkeit fordert. Der Grund hierzu liegt namentlich in zwei Verhältnissen, erstens in der Schwierigkeit, genau dieselbe Temperatur im Eudiometer bei der ersten und der zweiten Ablesung zu erhalten, zweitens in dem Drucksteigen im Apparat während der Reaktion, wodurch die physisch absorbierte Luftmenge verschieden wird. Der zufällige Fehler bei einer Bestimmung kann auch 3—4% des Wertes betragen.

Alle die folgenden Versuche sind deswegen mit einem Apparat ausgeführt worden, bei dem diese Fehlerquellen ausgeschlossen sind. Der Apparat ist nach demselben Prinzip wie der Haldanesche Apparat zur Sauerstoffbestimmung im Blut nach der Ferricyanidmethode¹⁾ konstruiert. Der einzige Unterschied besteht darin, daß ich statt des Kontrollgefäßes, das ausgelassen ist, Thermometer nicht allein im Wasserbad, sondern auch im Reaktionsgefäß und in dem Wasser-mantel der Bürette angebracht habe. Ein solcher Apparat gestattet das notwendige Schütteln des Behälters, in dem die Reaktion vor sich geht, und eine genaue Kontrolle der Tem-

¹⁾ Practical Physiology by M. S. Prembrey, 1910. S. 191.

peratur, wie auch, daß der Druck im Apparat bei den beiden
Ableesungen derselbe werden kann.

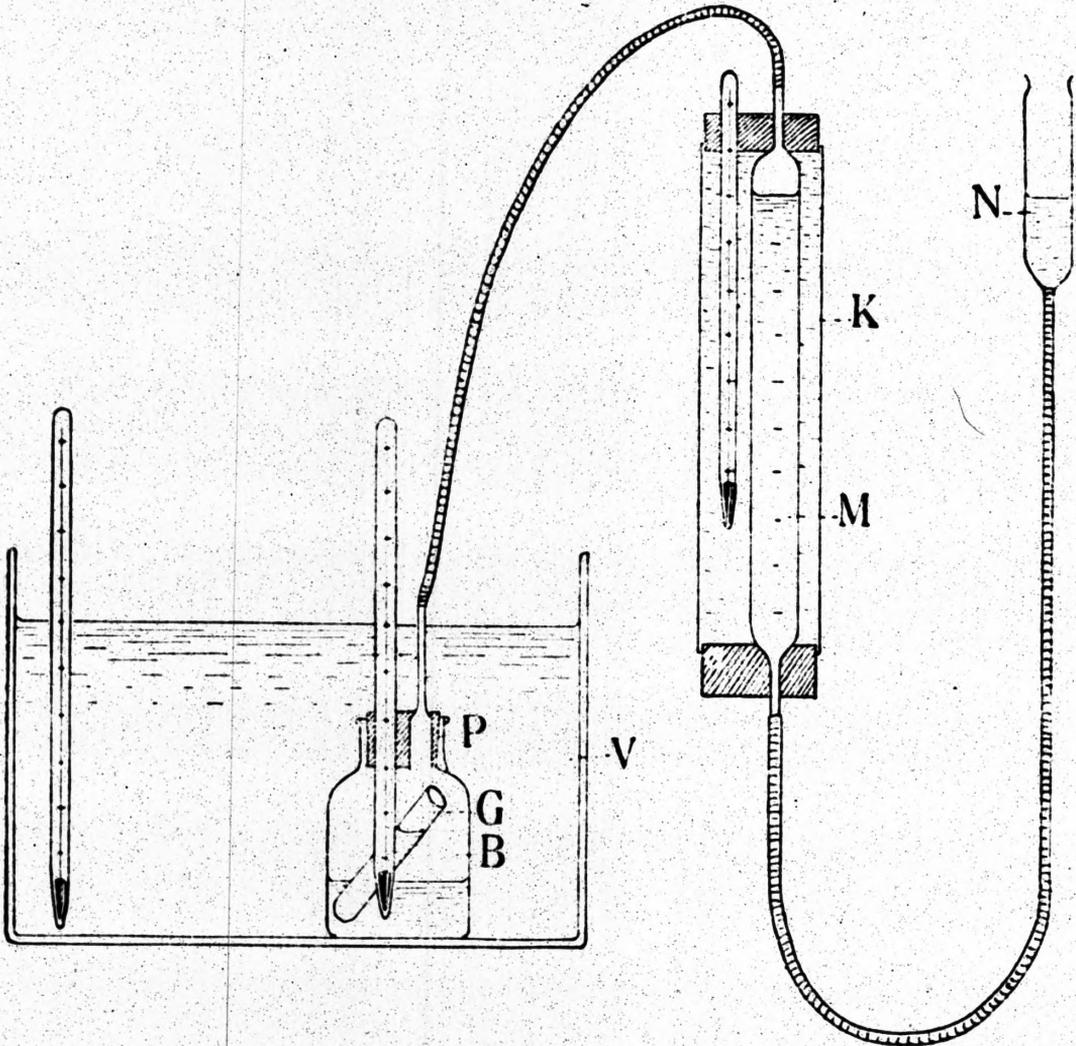


Fig. 1.

Eine Bestimmung wird folgendermaßen vorgenommen. Man sorgt erst dafür, daß die Temperatur im Wasserbad V und in dem Wassermantel der Bürette die gleiche ist, am besten Zimmertemperatur. In das Reaktionsgefäß B gießt man eine bestimmte Menge Bromnatron, in der Regel 15 ccm; in das kleine Glas G wird genau 1 ccm von der Lösung gegossen, die untersucht werden soll; das Glas wird vorsichtig in dem Behälter angebracht, der Apparat wird mit einem doppelt durchbohrten Kautschuckstopfen P geschlossen, und der Behälter wird in das Wasserbad hinabgesenkt. Wenn die Temperatur im Behälter dieselbe wie die des Wasserbades

geworden ist, stellt man die Flüssigkeit in den Niveaubehälter N in gleicher Höhe mit der Flüssigkeit in der Bürette M, die in $1/10$ ccm eingeteilt ist, und das Luftvolumen wird abgelesen. Dann mischt man das Reagens und die Lösung, und der Behälter wird mehrmals geschüttelt und wieder in das Wasserbad hineingesenkt; wenn alle Gasentwicklung aufgehört hat, und wenn die Temperatur im Behälter dieselbe geworden ist wie die des Wasserbades, stellt man die Flüssigkeiten in den Niveaubehälter und in der Bürette wieder in dieselbe Höhe, und das Luftvolumen wird abgelesen. Dann liest man die Temperatur und den Barometerstand ab, und die gefundene Volumendifferenz wird auf 0° , 760 mm Hg-Druck und Trockenheit reduziert. Das Gewicht des Stickstoffs findet man dann durch Multiplikation mit 1,256.

I. Untersuchungen über Dekomposition des Harnstoffs mit Natriumhypobromit.

Bei dieser Versuchsreihe habe ich reine Harnstofflösungen verwendet und an diesen untersucht:

1. Die Wirkung von Bromnatron von verschiedener Zusammensetzung, 2. von Traubenzuckerzusatz, 3. der Temperatur und 4. der Konzentration.

Zusammensetzung der bei den folgenden Versuchen angewendeten Reagentien.

Angewendet bei Versuch Nr.	Das Reagens wird in dem folgenden bezeichnet werden als:	100 ccm Bromnatron enthalten		Das Verhältnis Br/NaOH nach Gewicht
		NaOH g	Brom g	
I	R I	26,25	40,00	1,524
II	R II	28,00	21,33	0,762
III	R III	7,64	5,82	0,762
IV	R IV	4,38	3,33	0,762
V	R V	7,70	3,33	0,433
VI	R VI	3,08	1,33	0,433
VII	R VII	29,70	3,23	0,109
VIII	R VIII	29,86	1,62	0,054

Versuch I.

Zu jeder Bestimmung wird 1 ccm von einer Harnstofflösung genommen,
die 9,19 mg N pro Kubikzentimeter enthält.

7 ccm von Bromnatron R I.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	7,92	7,98	9,19	86,8
2	8,04			

Versuch II.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.

7 „ „ Bromnatron R II.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	8,38	8,34	9,19	90,8
2	8,28			
3	8,34			
4	8,37			

Versuch III.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.

15 „ „ Bromnatron R III.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	8,51	8,46	9,19	92,1
2	8,38			
3	8,48			
4	8,40			
5	8,51			

Versuch IV.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.
15 » » Bromnatron R IV.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	8,49			
2	8,48	8,49	9,19	92,4

Versuch V.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.
15 » » Bromnatronlauge R V.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	8,88			
2	8,89	8,87	9,19	96,5
3	8,84			

Versuch VI.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.
30 » » Bromnatron R VI.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	8,87			
2	8,82	8,85	9,19	96,3
3	8,87			

Versuch VII.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.
15 » » Bromnatron R VII.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	9,07			
2	9,01	9,04	9,19	98,4
3	9,05			

Versuch VIII.

1 ccm von derselben Harnstofflösung.
30 Bromnatron VI.

	a) N in mg pro ccm nach der Brom- natronmethode	b) Durchschnitts- zahl	c) N in mg pro ccm nach Kjeldahl	d) b/c 100
1	9,27			
2	9,19			
3	9,14	9,19	9,19	100
4	9,16			

Wie aus den obigen Versuchen ersichtlich ist, habe ich, im Gegensatz zu früheren Untersuchern, gefunden, daß eine Verdünnung mit Wasser die entwickelte Stickstoffmenge nicht herabsetzt, vorausgesetzt, daß ein Überschuß von dem Reagens vorhanden ist. Die Versuche II, III und IV zeigen sogar das entgegengesetzte Verhältnis, indem die konzentrierte Natriumhydroxydlösung eine geringere Luftmenge ergibt als die verdünnten Reagentien; während sich kein Unterschied nachweisen läßt, je nachdem die Verdünnung größer oder kleiner ist.

Die Versuche I, II, V, VII und VIII zeigen in Übereinstimmung mit Quinquauds Ergebnissen, daß, je weniger Brom im Verhältnis zu Natriumhydroxyd das Reagens enthält, um so größer die Gasentwicklung ist.

Da das in Versuch I angewandte Reagens nicht so viel Brom enthält, wie die Natriumhydroxydlösung aufnehmen konnte, habe ich auch den Versuch mit einem Reagens gemacht, das ungefähr so viel Brom enthielt, wie aufgenommen werden konnte, was 1 ccm Brom zu ca. 5,2 ccm 30%igem Natriumhydroxyd + 14,8 Wasser¹⁾ entspricht.

Die Gasmenge, die mit diesem Reagens entwickelt wurde, entspricht 93,4% von der Stickstoffmenge des Harnstoffes. Dieser Versuch schien also im Widerspruch zu dem vorhergehenden zu stehen, aber dies war nur scheinbar, indem eine Analyse des entwickelten Gases ergab, daß es CO₂ enthielt, wie es sich auch zeigte, daß die Flüssigkeit nach der Reaktion

¹⁾ BrNaOH = 205.

nicht mehr alkalisch reagierte. Zwischen R I und dem hier erwähnten Reagens wird man wohl ein Reagens finden können, das die geringst mögliche Gasentwicklung gibt, da mir dies aber weder von theoretischem noch von praktischem Interesse zu sein scheint, habe ich keine diesbezüglichen Versuche mehr angestellt.

Wie Seite 382 angeführt, fand Mehu und nach ihm Moreigne, daß Harnstoff unter Einwirkung von Bromnatron eine größere Stickstoffmenge abgibt, wenn man eine gewisse Menge Traubenzucker hinzusetzt. Moreigne fand ferner, daß es sich mit den Ammoniaksalzen ebenso verhielt. Er wendet ein Reagens von folgender Zusammensetzung an: 1 ccm Brom + 12 ccm konzentriertes Natron + 6 ccm Wasser und findet damit in einer Harnstofflösung ohne Traubenzuckerzusatz 89,2%, nach Traubenzuckerzusatz jedoch 99,6% der berechneten Stickstoffmenge. In einer Ammoniumchloridlösung fand Moreigne ohne Traubenzuckerzusatz 92,0%, nach Traubenzuckerzusatz jedoch 99,1% der berechneten Stickstoffmenge. Er empfiehlt deswegen einen Zusatz von Traubenzucker zum Harn, ehe man Bestimmungen mit Bromnatron unternimmt.

Da es mir schien, als bedürfe dies Verhältnis einer näheren Untersuchung, habe ich einen Versuch von gleicher Art wie die Moreignes gemacht.

Versuch IX.

1 ccm von derselben Harnstofflösung wie in den vorhergehenden Versuchen. Es wird Bromnatron R V und R VIII und eine Traubenzuckerlösung von 25% angewendet.

Die Zahlen in Reihe c sind die Durchschnittszahlen von 3 Bestimmungen.

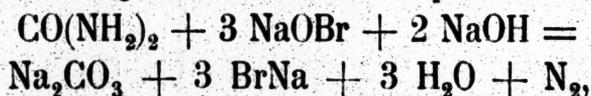
a)	b)	c)	d)	e)
Reagens	Traubenzucker in ccm	N in mg pro ccm nach der Bromnatronmethode	N in mg pro ccm nach Kjeldahl	c/d 100
R V	0	8,87	9,19	96,5
R V	1	9,29	9,19	101,1
R VIII	0	9,19	9,19	100,0
R VIII	1	9,35	9,19	101,7

Ein Kontrollversuch mit Bromnatron und Traubenzuckerlösung ohne Harnstofflösung ergab keine Gasentwicklung.

Der Versuch zeigt also, daß die entwickelte Gasmenge mit bezw. 4,7% und 1,7% vermehrt wird, ferner aber auch, daß die entwickelte Gasmenge größer ist als die totale Stickstoffmenge des Harnstoffs. So ist es denn einleuchtend, daß die Vermehrung nicht auf Stickstoff allein zurückzuführen ist, sondern daß durch den Prozeß noch andere Gase entwickelt sein müssen.

Die Frage ist nun, von welchen anderen Gasen kann hier die Rede sein?

Gewöhnlich nimmt man an, daß der Harnstoff durch Bromnatron auf folgende Weise dekomponiert wird:



also eine vollständige Oxydation des Kohlenstoffs. Da es sich nun herausstellt, daß die freigewordene Gasmenge durch Zusatz eines reduzierenden Stoffes größer wird, als die Menge, die dem gesamten Harnstickstoff entspricht, so liegt die Annahme nahe, daß die Vermehrung darauf beruhen könnte, daß ein Teil des Kohlenstoffes unvollständig oxydiert wurde, sodaß sich CO statt CO₂ bildete. Der große Überschuß an Natriumhydroxyd in Bromnatron R V und R VIII schließt freies CO₂ aus.

Um Klarheit hierüber zu erlangen, habe ich Analysen von dem entwickelten Gase gemacht.

Der Apparat, mit dem die Analysen ausgeführt wurden, ist zur Analyse von Luft bestimmt, die brennbare Gase enthält. Der Apparat besteht außerdem aus einer Luftbürette, aus einer Kohlensäureabsorptionspipette und einer Verbrennungspipette. Dadurch wird es möglich, nicht nur die Menge des brennbaren Gases zu bestimmen, sondern auch innerhalb einer Reihe von Gasen zu entscheiden, welches brennbare Gas es ist. Trägt man Sorge, die Kohlensäure aus der Luft zu entfernen, die man zur Analyse in den Apparat eingenommen hat, ehe man verbrennt, so kann man nicht nur die Volumenverminderung der Luft durch Verbrennung, sondern auch die durch Verbrennung gebildete Kohlensäure messen. Wenn das brenn-

bare Gas Kohlenoxyd ist, so wird die Volumenverminderung bei der Verbrennung genau halb so groß sein wie die durch die Verbrennung gebildete Kohlensäure, indem $2 \text{ CO} + \text{O}_2 = 2 \text{ CO}_2$.

Versuch X.

Analysen von durch Dekomposition des Harnstoffes mit Bromnatron entwickeltem Gas; teils mit, teils ohne Zusatz von Traubenzucker. 1 ccm von einer Harnstofflösung, die 9,19 mg N pro Kubikzentimeter enthält. Es wird Bromnatron R V und R VIII und eine Traubenzuckerlösung von 25% angewendet.

Die angeführten Luftvolumina sind auf 0°, 760 mm Hg-Druck und Trockenheit reduziert.

Reagens	Traubenzuckerlösung in ccm	Entwickeltes Luftvolumen in ccm	Volumenverminderung durch Verbrennung in ccm	Volumen von der durch Verbrennung entwickelten CO_2 in ccm	CO in dem entwickelten Gas %
R V	0	7,06	0,012	0,021	0,30
R V	1	7,40	0,135	0,271	3,67
R VIII	0	7,32	0,023	0,045	0,62
R VIII	1	7,45	0,053	0,104	1,40

Die Gasanalysen ergeben also, daß außer Stickstoff ein brennbares Gas gebildet wird, und daß dies Gas CO sein muß, da die durch Verbrennung gebildete Kohlensäuremenge doppelt so groß ist wie die Volumenverminderung durch Verbrennung.

Das Gas, das durch Dekomposition des Harnstoffes mit den Reagentien R V und R VIII entwickelt wird, ist hier im Prozentverhältnis zu ihrer totalen Stickstoffmenge gerechnet, die 9,19 mg pro Kubikzentimeter beträgt:

Reagens	Traubenzuckerlösung in ccm	N %	CO %	N-Vermehrung in %	CO-Vermehrung in %
R V	0	96,2	0,3		
R V	1	97,4	3,7	1,2	3,4
R VIII	0	99,4	0,62		
R VIII	1	100,3	1,42	1,09	0,8

Es wird also etwas Kohlenoxyd entwickelt, mag man nun Traubenzucker hinzusetzen oder nicht, aber die Kohlenoxydmenge wird größer, wenn Traubenzucker vorhanden ist. Es zeigt sich ferner, daß die vermehrte Gasentwicklung durch Traubenzuckerzusatz nicht allein eine Folge der Vermehrung der Kohlenoxydmenge ist.

Die vermehrte Kohlenoxydbildung teils durch bromärmeres Reagens, teils durch Traubenzuckerzusatz zeigt, daß der Oxydationsprozeß in diesem Falle weniger eingreifend in bezug auf den Kohlenstoff gewesen ist. Es handelt sich nun darum, ob die vermehrte Stickstoffentwicklung auf dieselbe Weise erklärt werden kann.

Aus der ersten Versuchsreihe ging hervor, daß, wenn ein bromreiches Reagens auf eine Harnstofflösung wirkt, ein beträchtliches Stickstoffdefizit entsteht, das sich bis zu 13,8% und vielleicht noch etwas mehr bei Anwendung eines passenden Reagens belaufen kann. Man kann sich kaum denken, daß der dementsprechende Teil des Harnstoffes unbeeinflusst sein sollte, wenn sich das Reagens im Überschuß findet, sondern vielmehr, daß er zu anderen Verbindungen umgebildet ist, wodurch der Stickstoff nicht frei wird.

Die Frage ist nun, zu welchen anderen Verbindungen ist dieser Rest umgebildet?

Um diese Frage zu lösen, habe ich folgende Untersuchungen von Harnstofflösungen vorgenommen, die mit Bromnatron reagiert haben:

1. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.
2. Reduktion mit Wasserstoff und Bestimmung der überdestillierten Ammoniakmenge.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wurde an 10 ccm Harnstofflösung gemacht, deren Stickstoffmenge vor der Behandlung mit Bromnatron 91,9 mg betrug. Den 10 ccm Harnstofflösung wurden 150 ccm Bromnatron R III hinzugesetzt (die dabei entwickelte Luftmenge entspricht nach Versuch III 92,1% des Stickstoffs). Die Flüssigkeit wird geschüttelt, in einen Kjeldahl-Kolben gegossen und einige Zeit mit ein wenig kon-

zentrierter H_2SO_4 gekocht, um das Brom¹⁾ herauszutreiben und einen Teil des Wassers zu verdampfen. Darauf wird die Kjeldahl-Bestimmung auf gewöhnliche Weise vorgenommen. Zwei solche Bestimmungen zeigten keinen meßbaren Stickstoffgehalt.

Da also der Stickstoff, der bei der Bromnatronmethode nicht gefunden wurde, auch bei einer Kjeldahl-Analyse nicht nachgewiesen werden kann, muß er während des Dekompositionsprozesses zu einer der Sauerstoffverbindungen des Stickstoffs weiter oxydiert sein.

Um zu beweisen, daß sich eine solche Stickstoffverbindung wirklich in der durch Bromnatron dekomponierten Harnstofflösung findet, habe ich erst einen qualitativen und dann einen quantitativen Nachweis davon unternommen. Qualitativ habe ich die in der unorganischen Analyse allgemein angewandte Methode zum Nachweis der Salpetersäure in Flüssigkeiten, die Brom oder Jod enthalten, benutzt: der stark alkalischen Flüssigkeit werden Zinkspäne zugesetzt, die mit CuSO_4 angefeuchtet sind, die Flüssigkeit wird erwärmt; während der Wasserstoffentwicklung wird alsdann die Salpetersäure in Ammoniak reduziert werden.

Quantitativ habe ich dasselbe Prinzip benutzt. Zu 10 ccm Harnstofflösung mit Stickstoffinhalt 91,9 mg werden ca. 40 ccm Bromnatron R II, hinzugesetzt (das nach Versuch II eine Gasentwicklung gibt, die 90,8% Stickstoff entspricht). Wenn die Gasentwicklung vorbei ist, wird die Flüssigkeit in einen Jena-glaskolben mit einem doppelt durchbohrtem Kautschukstopfen getan; durch die eine Bohrung wird der Kolben auf gewöhnliche Weise mit dem Destillationsapparat in Verbindung gesetzt; durch die andere Bohrung wird eine enge Glasröhre geführt, die oben mit einem Gummischlauch und einem Quetschhahn versehen ist, dies ermöglicht es, daß man während des Reduktionsprozesses Natriumhydroxydlösung hinzusetzen kann.

¹⁾ Nach Untersuchungen von A. C. Andersen (Skandin. Archiv f. Physiol., Bd. 25, S. 102 [1911]) scheint keine Gefahr vorhanden zu sein, daß das freie Brom unter diesen Verhältnissen etwa vorhandene Aminogruppen zu freiem Stickstoff oxydieren sollte.

ohne daß die Destillation unterbrochen wird. Es erwies sich nämlich als notwendig, eine bedeutende Flüssigkeitsmenge überzudestillieren, ehe der Prozeß, der mehrere Stunden währte, beendet war.

Das Ergebnis ist in folgender Tabelle aufgestellt:

a)	b)	c)	d)
Der totale N-Inhalt in 10 ccm Harnstofflösung in mg	Die durch Bromnatron entwickelte Luftmenge, berechnet wie N in mg	N als Ammoniak gefunden nach Destillation in mg	$b + c$
91,9	83,4	9,00	92,4

Die nach der Bromnatronmethode fehlende Stickstoffmenge erweist sich also wirklich vorhanden in Form einer Sauerstoffverbindung des Stickstoffs.¹⁾

Während man bisher angenommen hat, daß durch Oxydierung des Harnstoffs mit Bromnatron der gesamte Kohlenstoff zu CO_2 oxydiert würde, sieht man jetzt, daß auch CO gebildet wird, und ferner, daß der Teil des Stickstoffs, der sich bei Oxydierung nicht als freier Stickstoff erweist, zu einer Sauerstoffverbindung weiter oxydiert wird, und daß die relativen Mengen dieser Verbindungen von der Zusammensetzung des Bromnatrons abhängig sind. Je mehr Brom im Verhältnis zu Natriumhydroxyd das Reagens enthält, um so mehr von dem Stickstoff wird zu Sauerstoffverbindungen oxydiert, und um so mehr von dem Kohlenstoff zu CO_2 . Je weniger Brom im Verhältnis zu Natriumhydroxyd das Reagens enthält, um so mehr von dem Kohlenstoff wird nur zu CO und um so mehr von dem Stickstoff nur zu freiem Stickstoff. Und setzt man außerdem noch ein Reduktionsmittel wie Traubenzucker hinzu, so wird der Oxydierungsprozeß noch schwächer, indem nun in der Tat der gesamte Stickstoff frei wird und ein größerer Teil des Kohlenstoffes zu CO wird.

¹⁾ Die Summe b und c wird sogar c. $\frac{1}{2}\%$ größer als die Gesamtstickstoffmenge, aber teils ist es wahrscheinlich, daß auch das durch R II entwickelte Gas ein wenig CO enthält, möglicherweise bis zu $0,2\%$, teils kann eine geringe Abweichung auf einem Versuchsfehler beruhen.

Um festzustellen, inwiefern die Harnstoffkonzentration Einfluß auf die entwickelte Luftmenge hat, habe ich ein Paar einzelne Versuche angestellt und dadurch die Bestätigung von dem erhalten, was man von vorneherein auch annehmen mußte, daß nämlich die abgegebene Gasmenge proportional mit der Konzentration ist, solange ein Überschuß von dem Reagens vorhanden ist.

1. Bei einer Harnstofflösung erhält man als Durchschnittszahl von 4 Bestimmungen pro Kubikzentimeter 8,18 mg.

2. Bei der im Verhältnis von 1 : 2 verdünnten Lösung erhält man als Durchschnittszahl von 3 Bestimmungen pro Kubikzentimeter 4,10 mg.

3. Bei der im Verhältnis von 1 : 4 verdünnten Lösung erhält man als Durchschnittszahl von 4 Bestimmungen pro Kubikzentimeter 2,10 mg.

Den Einfluß der Temperatur auf den Dekompositionsprozeß habe ich nur bei 2 Temperaturen um Zimmertemperatur herum untersucht, um zu sehen, ob Schwingungen von einigen wenigen Graden einen Einfluß auf das Ergebnis haben.

Versuch XI.

Temperatur	N in mg pro cem Harnstofflösung	Durchschnittszahl
13,0°	8,88	8,87
	8,89	
	8,84	
18,0°	8,80	8,89
	8,92	
	8,98	
	8,87	

Ein Temperaturunterschied von 5° ist also ohne erheblichen Einfluß auf das Ergebnis.

Da auch angeführt worden ist, daß die Größe des Behälters, in dem die Reaktion vor sich geht, von Einfluß auf das Ergebnis sein könnte, so will ich hierzu nur bemerken, daß dieser Einwand seine Berechtigung haben mag, wo es sich um solche Apparate handelt, in denen die Gasentwicklung

eine erhebliche Druckerhöhung bewirkt; die physisch absorbierte Gasmenge wird alsdann in einem größeren und in einem kleineren Apparat ein wenig verschieden sein. Aber bei einem Apparat wie dem hier benutzten, wo der Druck nicht steigt, ist das Volumen des Apparates folglich gleichgültig.

Endlich habe ich einige Harnstoffbestimmungen von Harn vor und nach Zusatz von bekannten Harnstoffmengen vorgenommen.

Versuch XII.

Reagens	Gefunden N in mg pro ccm	Berechnet N in mg pro ccm
R V Harn	9,37	
R V 1 Teil Harn + 1 Teil Harnstofflösung .	9,10	9,12
R V Harn	7,62	
R V 1 Teil Harn + 1 Teil Harnstofflösung .	8,22	8,24
R VIII Harn	7,80	
R VIII 1 Teil Harn + 1 Teil Harnstofflösung .	8,50	8,50

II. Untersuchungen über Dekompositionen von Ammoniumchlorid mit Natriumhypobromit.

Die Untersuchungen sind an reinen Ammoniumchloridlösungen vorgenommen; an diesen habe ich bestimmt: 1. Die Luftmenge, die durch Einfluß von 2 verschiedenen Bromnatronreagentien entwickelt wird, 2. die Einwirkung von Traubenzucker und 3. die Konzentration.

Versuch XIII.

1 ccm Ammoniumchloridlösung und bezw. 15 ccm Bromnatron R V oder 30 ccm Bromnatron R VIII.

a) Reagens	b) N in mg pro ccm nach der Bromnatronmethode	c) N in mg pro ccm nach Destillation	d) b/c 100
R V	5,12 ¹⁾ + 0,02	5,25	97,5
R VIII	5,04 ²⁾ + 0,03	5,25	96,0

¹⁾ Durchschnittszahl von 8 Bestimmungen.

²⁾ Durchschnittszahl von 7 Bestimmungen.

Versuch XIV.

1 ccm Ammoniumchloridlösung.
20 » Bromnatron R V.
25%ige Traubenzuckerlösung.

a) Traubenzuckerlösung in ccm	b) ¹⁾ N in mg pro ccm nach der Bromnatronmethode	c) N in mg pro ccm nach Destillation	d) b/c 100
0	5,12	5,25	97,5
0,1	5,09		96,9
0,15	5,25		100,0
0,2	5,34		901,7
0,3	5,47		104,2
0,7	5,47		
0,8	5,48		
1,0	5,48		

Ein Kontrollversuch mit Traubenzuckerlösung und Bromnatron ergab keine Luftentwicklung.

Versuch XV.

Analyse von Gas, entwickelt durch Dekomposition von Ammoniumchlorid mit Bromnatron R V, teils mit, teils ohne Traubenzuckerzusatz. Dieselbe Ammoniumchloridlösung wie bei den vorhergehenden Versuchen (5,25 mg N pro Kubikzentimeter). 25%ige Traubenzuckerlösung. Die angeführten Volumina sind auf 0°, 760 mm Hg-Druck und Trockenheit reduziert.

Traubenzuckerlösung in ccm	Entwickeltes Luftvolumen in ccm	Volumenverminderung durch Verbrennung in ccm	Volumen von der durch Verbrennung entwickelten CO ₂ in ccm	CO in der entwickelten Luft %
0	4,08	0	0	0
1	4,36	0,345	0,685	15,7

Das entwickelte Gas wird alsdann, als Prozent von der totalen Stickstoffmenge des Ammoniumchlorids berechnet, die 5,25 mg = 4,18 ccm pro Kubikzentimeter beträgt, sein:

Traubenzuckerlösung	N	CO	N + CO	N- Vermehrung	CO- Vermehrung
0	97,5	0	97,5	—	—
1	85,9	16,3	104,2	9,6	16,3

¹⁾ Das entwickelte Gas ist hier vorläufig als Stickstoff berechnet.

Versuch XIII ergab, daß Ammoniumchlorid ebenso wie Harnstoff nur einen Teil seines Stickstoffs abgibt. Mit Bromnatron R V wurden 97,5% des gesamten Stickstoffs frei.

Da liegt denn die Annahme nahe, daß der Rest des Stickstoffs ebenso wie bei der Harnstoffdekomposition zu einer Sauerstoffverbindung umgebildet ist.

Um zu sehen, ob diese Annahme richtig ist, habe ich folgende Untersuchungen gemacht:

1. 10 ccm Ammoniumchloridlösung mit Totalstickstoffinhalt 52,5 mg, wird mit Bromnatron R V dekomponiert und einer Destillation unterworfen. Die Flüssigkeit enthielt keinen Ammoniak.

2. Eine qualitative Probe für Salpetersäure (Kochen mit in CuSO_4 angefeuchteten Zinkspänen) an einer Ammoniumchloridlösung, die mit Bromnatron R V dekomponiert war. Die Probe ergab ein positives Resultat.

Bei Traubenzuckerzusatz ist das Verhältnis etwas anders als bei Zersetzung des Harnstoffes. Es bildet sich auch hier CO , aber dies Gas muß hier notwendigerweise durch Traubenzucker gebildet sein. Im Gegensatz zu dem Verhältnis bei Harnstoff wird die frei gewordene Stickstoffmenge hier vermindert, so daß statt 97,5% nach Traubenzuckerzusatz nur 87,9% Ammoniakstickstoff frei wird.

Um festzustellen, ob der Traubenzucker geradezu die Umbildung eines Teils des Ammoniaks verhindert hat, habe ich folgende Untersuchung vorgenommen:

10 ccm Ammoniumchloridlösung mit Totalstickstoffinhalt 52,5 mg wird mit Bromnatron R V nach Zusatz von 10 ccm 25%iger Traubenzuckerlösung dekomponiert und einer Destillation unterworfen. Als Ammoniak fand ich dabei 3,22 mg Stickstoff, also 6,10% des Totalstickstoffs.

Zu welchen Verbindungen der übrigbleibende Stickstoff umgebildet ist, habe ich nicht untersucht.

In bezug auf den Einfluß der Ammoniakkonzentration habe ich nur einen einzelnen Versuch gemacht.

1. Bei einer Ammoniumchloridlösung erhält man als Durchschnittszahl von 4 Bestimmungen pro Kubikzentimeter 4,70 mg N.

2. Bei der im Verhältnis 1 : 2 verdünnten Lösung erhält man als Durchschnittszahl von 4 Bestimmungen pro Kubikzentimeter 2,34 mg N.

III. Die Einwirkung von Natriumhypobromit auf einzelne von den anderen stickstoffhaltigen Verbindungen des Harns.

Da neuere Untersuchungen¹⁾ ergeben haben, daß ca. 2% von dem Gesamtstickstoff als Aminosäuren und Polypeptide gefunden werden, so habe ich die Wirkung von Bromnatron auf 1%ige Lösungen von einer Reihe von Aminosäuren, nämlich Glycin, Alanin, Glutaminsäure, Asparagin und Tryptophan, sowie auf säuregespaltenes Casein²⁾ untersucht. Keiner von diesen Stoffen ergab mit Bromnatron eine Gasentwicklung.

Ebenfalls habe ich die Wirkung auf Hippursäure in 1%iger Lösung versucht, habe aber auch hier keine Gasentwicklung festgestellt.

Dahingegen ergaben, in Übereinstimmung mit früher erwähnten Untersuchungen, Kreatin, Kreatinin und Harnsäure Gasentwicklung mit Bromnatron.

Versuch XVI.

2 ccm von einer 1%igen Kreatinlösung
15 > Bromnatron.

a) Reagens	b) N in mg pro ccm nach der Bromnatronmethode	c) Durchschnitts- zahl	d) Berechnet N in mg pro ccm	e) c/d 100
R V	0,52	0,51	3,72	13,7
—	0,49			
—	0,51			
—	0,50			
R VII	nach 10 Minuten 0,64		3,72	17,2
R VII	nach 60 Minuten 1,18		3,72	31,7

¹⁾ V. Henriques. Über quant. Bestimm. der Aminosäuren im Harn, Diese Zeitschrift, Bd. 60, Heft 1, 1909. — V. Henriques u. S. P. L. Sørensen, Diese Zeitschrift, Bd. 63, Heft 1, 1909; *ibid.* Bd. 64, Heft 2, 1910.

²⁾ Die meisten von diesen Stoffen sind mir freundlichst von Herrn Prof. Henriques überlassen worden.

Versuch XVII.

1 ccm von 1%iger Kreatinlösung.
15 Bromnatron.

a) Reagens	b) N in mg pro ccm nach der Bromnatronmethode	c) Durchschnitts- zahl	d) Berechnet N in mg pro ccm	e) c/d 100
R V	1,72	}	1,72	3,21
—	1,71			
—	1,73			
—	1,72			
R VII	1,44	}	1,49	3,21
—	1,54			

Versuch XVIII.

Eine Lösung von Harnsäure in Natriumhydroxyd: 1 ccm entspricht 3,33 mg Harnsäure. Zu jeder Bestimmung werden 2 ccm der Lösung genommen.
15 ccm Bromnatron R V.

	a) Nach 5 Minuten N in mg pro ccm	b) Nach 10 Min. N in mg pro ccm	c) Nach 15 Min. N in mg pro ccm	d) ¹⁾ Nach 45 Min. N in mg pro ccm	e) Berechnet N in mg pro ccm	f) a/c 100	g) d/e 100
1.	0,23	0,29	0,35	—	1,11	20,7	—
2.	0,23	0,28	0,35	0,42	1,11	—	—
3.	—	—	0,35	0,42	1,11	—	37,8

Mit Bromnatron R V ergibt also Kreatin eine Gasentwicklung, die 13,7% entspricht, Kreatin 53,6% und Harnsäure nach Verlauf von 5 Minuten 20,7%, nach Verlauf von 45 Minuten jedoch 37,8% von der theoretischen Stickstoffmenge.

Da allein die Untersuchung dieser drei Stoffe, deren Menge im Harn weder prozentisch noch absolut konstant ist, ergibt, daß es auf Grundlage solcher Untersuchungen doch nicht möglich sein wird, irgend eine gänzlich zuverlässige Korrektur für diese und die übrigen stickstoffhaltigen Bestandteile einzuführen, so habe ich nicht mehrere von diesen Stoffen mit Bromnatron untersucht. Wie erwähnt, wurde bereits früher Allantoin untersucht, das 25–50% ergab, und Oxyprotein-

¹⁾ Drei nach Verlauf von 45, 55 und 60 Minuten vorgenommene Ablesungen ergaben dieselben Zahlen.

säure, die ca. 20% ihres Stickstoffes ergab. Aber außer diesen Stoffen hat man auch im Harn eine ganze Reihe anderer stickstoffhaltiger Bestandteile nachgewiesen, so außer den Farbstoffen des Harns einige mit Kreatinin verwandte, wie Methylguanidin, Vitialin, außerdem Novain, Neosin, Antoxyproteinsäure und Alloxyproteinsäure.

Will man die Ergebnisse der obigen Versuche zusammenfassen, so sieht man, daß ein Teil der Fehlerquellen, die man auf die Bromnatronmethode zurückgeführt hat, entweder garnicht vorhanden sind, oder sehr leicht vermieden werden können.

Die Versuche haben gezeigt, wie die entwickelte Gasmenge von der Zusammensetzung des Bromnatrons und namentlich von dem Verhältnis des Broms zu Natriumhydroxyd abhängig ist. So muß man denn ein Reagens wählen, mit dem leicht zu arbeiten ist, und an einer Harnstofflösung mit bekanntem Stickstoffinhalt die Größe der Korrektur bestimmen.¹⁾

Wie gezeigt, ist die Harnstoff- und Ammoniakkonzentration ohne Einfluß, vorausgesetzt, daß Reagens im Überschuß vorhanden ist; dies kann leicht dadurch bestimmt werden, daß die Flüssigkeit sich nach der Reaktion gelb verhält, während sie sonst in der Farbe nachläßt.

Temperaturveränderung bis zu 5° hat auch keinen nachweisbaren Einfluß auf die Dekomposition. Dahingegen ist es natürlich von der größten Wichtigkeit für die Genauigkeit der Bestimmung, daß die Luft in dem Apparat beim Ablesen vor und nach der Reaktion entweder dieselbe Temperatur hat,

¹⁾ Bei den folgenden Versuchen habe ich Bromnatron R V (1 ccm Brom + 24,5 ccm 30%ige NaOH + 70 ccm Wasser) angewendet. Die Harnstoffkorrektur wird alsdann 100/96,5 und die Ammoniakkorrektur 100/97,5 ergeben, da aber der Ammoniakstickstoff gewöhnlich nur ca. 4% von dem Harnstoffstickstoff beträgt, wird der Fehler nur gering sein, selbst wenn man mit einer Korrektur von 100/96,5 für beide Stoffe rechnet. Aus praktischen Gründen habe ich es vorgezogen, R V zu benutzen statt R VIII, das eine dem Harnstoff genau entsprechende Gasmenge ergibt, weil mit R V leichter und schneller zu arbeiten ist als mit der starken Natronlösung, die während der Reaktion sehr feinschäumend wird.

oder daß man genau den Unterschied kennt, um die abgelesenen Volumina danach korrigieren zu können.

Aus den Versuchen X und XIV geht hervor, daß Traubenzucker einen bedeutenden Einfluß auf den Dekompositionsprozeß hat, und ferner, daß verschiedene Mengen Traubenzucker verschiedenen Einfluß haben. Mit zuckerhaltigem Harn kann man daher keine genauen Resultate mit dieser Methode erzielen, denn selbst wenn man sicher wäre, daß die Traubenzuckerkonzentration so groß ist, daß man mit dem angewendeten Reagens eine maximale Gasentwicklung erzielte, so würde das Ergebnis doch weniger genau werden, indem die Harnstoff- und die Ammoniakkorrektion sehr verschieden ausfallen würde. Außerdem weiß man nichts darüber, wie Traubenzucker die Dekomposition der anderen stickstoffhaltigen Harnbestandteile beeinflusst.

Der einzige, freilich sehr ernste, Einwand, den man gegen die Anwendung der Bromnatronmethode bei normalem Harn ohne vorhergehende Behandlung des Harns erheben kann, bleibt der, daß ein Teil anderer Harnbestandteile ebenfalls unter Einwirkung von Bromnatron Gase entwickle. Kreatinin + Harnsäure + die übrigen stickstoffartigen organischen Harnbestandteile werden im normalem Menschenharn bis zu 8,2% und im stickstoffarmen Harn bis zu 26,9% des Totalstickstoffs des Harns angegeben. Geht man von diesen Zahlen aus, die eher zu niedrig sind, und will man rechnen, daß diese Stoffe im Durchschnitt nur 20% ihres Stickstoffs unter dem Einfluß von Bromnatron abgeben, so würde man dadurch Zahlen für Harnstoff + Ammoniak erhalten, die bezw. knapp 2% und gut 5% zu hoch sein würden. Da auch die absolute Menge dieser Stoffe in stickstoffreichem und stickstoffarmem Harn verschieden ist, wenn auch bedeutend weniger variabel als die prozentische Menge, und da sie sich ferner nicht mit derselben Leichtigkeit dekomponieren lassen, so würde es, wie ich bereits früher erwähnt habe, nicht möglich sein, sie mit hinreichender Genauigkeit zu korrigieren.

Um den Fehler zu beseitigen, oder vielmehr zu verringern, den diese Stoffe verursachen werden, habe ich deswegen den

Harn mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und dann an dem neutralisierten Filtrat Harnstoffbestimmungen nach der Bromnatronmethode vorgenommen.¹⁾

Von den anderen Methoden zur Harnstoffbestimmung im Harn, die in den späteren Jahren erschienen sind, muß nach Henriques und Gammeltofts²⁾ Untersuchungen die in der genannten Abhandlung beschriebene Methode als die beste angesehen werden.³⁾ Das Verfahren ist in den Hauptzügen das folgende: Ausfällen mit Phosphorwolframsäure, Zusatz von ca. $n/2$ -H₂SO₄, Autoklavierung bei 150° in 1½ Stunden und Ammoniakbestimmung mittels Durchlüftung nach Folin. Von Phosphorwolframsäure wird der Harnstoff nicht ausgefällt, dahingegen ein großer Teil von den anderen stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns, unter anderem der größte Teil des Ammoniaks.⁴⁾ Durch Autoklavierung wird der Harnstoff zu Ammoniak zersetzt.

Um mich von der Übereinstimmung der Bromnatronmethode mit dieser Methode zu überzeugen, habe ich einige Bestimmungen mit demselben Harn nach den beiden Methoden vorgenommen, teils mit, teils ohne vorhergehende Ausfällung mit Phosphorwolframsäure.⁵⁾

Versuch XII zeigt, daß der Harn selbst keinen Einfluß auf die Harnstoffbestimmung mit Bromnatron hat, indem Harnstoffbestimmung am Harn nach Zusatz bekannter Harnstoffmengen einen Stickstoffinhalt ergibt, der dem berechneten entspricht.

¹⁾ Dies Verfahren ist auch vorgeschlagen von Moreigne, Thèse p. l. Doct. en Méd., 1895, S. 156, und von Camerer, zit. Mörner, Skand. Arch. f. Phys., Bd. 14, S. 324; aber die Methode scheint nicht durch Vergleich mit anderen Methoden zur Harnstoffbestimmung im Harn ausprobiert zu sein.

²⁾ Skand. Arch. f. Phys., Bd. 25, S. 168 (Gedächtnisschreiben d. Manen Chr. Böhrs).

³⁾ Über die Mörner-Sjöqvistsche Methode u. a. siehe oben zitierte Abhandlung.

⁴⁾ Ibid. S. 163.

⁵⁾ Das Autoklavieren der Harnproben ist in dem physiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen vorgenommen worden, wofür ich Herrn Prof. Henriques meinen Dank anzunehmen bitte.

Die bei folgendem Versuch angewendete Phosphorwolframsäure habe ich an einer Harnstofflösung erprobt und fand kein Ausfällen.

Henriques und Gammeltoft¹⁾ haben untersucht, ob Phosphorwolframsäure Harnstoff im Urin ausfällt, indem sie dem Harn bekannte Harnstoffmengen zusetzten, mit Phosphorwolframsäure ausfällten, autoklavierten und den Ammoniak bestimmten; die gefundenen Stickstoffmengen entsprachen alsdann sehr genau den berechneten. Ich habe es daher für überflüssig gehalten, auf entsprechende Weise die Bromnatronmethode nach dem Ausfällen mit Phosphorwolframsäure auszuprobieren.

Das Ausfällen mit Phosphorwolframsäure habe ich auf folgende Weise aufgeführt: An 5 ccm Harn versucht man, wieviele Kubikzentimeter 10%iger Phosphorwolframsäure in "z-Schwefelsäure erforderlich sind zu vollständigem Ausfällen. Dann mißt man in einem 10 ccm-Meßkolben soviel Harn ab, daß Harn $\frac{1}{2}$ die Phosphorwolframsäure, die zum Ausfällen erforderlich ist, 10 ccm beträgt;²⁾ nach einer Weile filtriert man, und die Flüssigkeit wird neutralisiert mit 30% Natriumhydroxyd, aus einer in $\frac{1}{100}$ ccm eingeteilten Pipette hinzugesetzt. Der Verdünnungsgrad kann alsdann berechnet werden. Es ist notwendig zu neutralisieren, damit das Verhältnis Brom zu Natriumhydroxyd während der Reaktion nicht verändert wird. Da der Zusatz von Wasser zu einem Reagens, wo die Natronlauge im voraus verdünnt ist, keinen Einfluß hat, kann man zu einer Bestimmung 2 ccm Harn statt 1 ccm nehmen, wenn die Harnstoffkonzentration zu tief herabgesunken ist. In den untenstehenden Bestimmungen betrug die Stickstoffmenge pro Kubikzentimeter Flüssigkeit zwischen 2,25 mg und 4,06 mg.

Versuch XIX.

Die Zahlen geben den Stickstoff in mg pro Kubikzentimeter Harn an und sind die Durchschnittszahlen von zwei Bestimmungen.

¹⁾ Ibid. S. 163.

²⁾ Ich habe dies Verfahren vorgezogen, um den Harn so wenig wie möglich zu verdünnen.

Es wurde Bromnatron R V angewendet: die direkt gefundenen Zahlen sind daher mit 100/96,5 multipliziert.

	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)
	N nach B.m. ¹⁾	N nach B.m. nach Aus- fällen mit P. W. S. ²⁾	N nach Aut.m. ³⁾	N nach Aut.m. nach Aus- fällen mit P. W. S.	Am- moniak- N nach Durch- lüftung	N nach B.m. ÷ Am- moniak- N	N nach Aut.m. ÷ Am- moniak- N	a ÷ b	c ÷ d	d ÷ b
1.	9,11	—	9,60	8,54	0,42	8,67	9,18	—	1,06	—
2.	11,29	—	11,70	—	0,71	10,58	10,99	—	—	—
3.	6,92	—	7,52	6,78	0,33	6,59	7,19	—	0,74	—
4.	9,44	7,98	—	8,68	—	—	—	1,46	—	0,70
5.	10,89	9,49	11,18	10,16	—	—	—	1,40	1,02	0,67
6.	9,48	8,72	9,87	9,30	—	—	—	0,76	0,57	0,58
7.	9,62	8,74	10,12	9,47	—	—	—	0,88	0,65	0,73

Vergleicht man in der obigen Tabelle a und c und d, so sieht man, daß die Stickstoffmenge von Harn + Ammoniak wie von anderen teilweise dekomponierten stickstoffhaltigen Bestandteilen nach der Bromnatronmethode geringer ist als nach der Autoklavierungsmethode ohne vorhergehendes Ausfällen mit Phosphorwolframsäure, jedoch größer nach der Autoklavierungsmethode mit vorausgehendem Ausfällen mit Phosphorwolframsäure. Vergleicht man aber b und d, so sieht man, daß, wenn man ein Ausfällen mit Phosphorwolframsäure sowohl bei der Bromnatronmethode als auch bei der Autoklavierungsmethode anwendet, die erstere Methode die geringste Harnstoffzahl ergibt. Aus h und i ersieht man ferner, daß sich ein größerer Stickstoffunterschied bei der Bromnatronmethode geltend macht, je nachdem man mit Phosphorwolframsäure ausfällt oder nicht, als bei der Autoklavierungsmethode.

Die Erklärung hierfür muß meiner Ansicht nach die sein, daß nach dem Ausfällen mit Phosphorwolframsäure im Harn außer dem Harnstoff noch andere stickstoffhaltige Stoffe enthalten sind, u. a. Oxyproteinsäure, und daß diese Bestandteile

1) B.m. = die Bromnatronmethode.

2) P.W.S. = Phosphorwolframsäure.

3) Aut.m. = die Autoklavierungsmethode.

in höherem Grade durch Autoklavierung zersetzt werden als durch die Bromnatronmethode.

Daß dahingegen nach der Autoklavierung und der Durchlüftung, sowohl mit als auch ohne voraufgehende Phosphorwolframsäureausfällung keine Stoffe vorhanden sind, die Gase durch Bromnatronzusatz entwickeln können, davon habe ich mich überzeugt, indem ich bei einer Reihe also behandelter Harnproben Versuche mit Bromnatron machte. In keinem Falle ließ sich eine Gasentwicklung nachweisen.

Aus Henriques und Gammeltofts Untersuchungen geht hervor, daß die Autoklavierungsmethode an mit Phosphorwolframsäure ausgefälltem Harn Harnstoffzahlen ergibt, die niedriger und deshalb aller Wahrscheinlichkeit nach richtiger sind, als bei den anderen bisher angewandten Methoden.

Meine Untersuchungen zeigen, daß die an mit Phosphorwolframsäure ausgefälltem Harn angewandte Bromnatronmethode noch niedrigere Zahlen ergibt. Selbst diese Zahlen sind eher zu hoch als zu niedrig, da nicht alle von Bromnatron beeinflussbaren Stoffe mit Phosphorwolframsäure ausgefällt werden.

Resumé.

1. Bei der Dekomposition des Harnstoffes mit Natriumhypobromit wird nur ein Teil des Stickstoffes frei, der Rest wird zu Sauerstoffverbindungen des Stickstoffs umgebildet. Von dem Kohlenstoff wird nur ein Teil zu CO_2 oxydiert, der Rest wird nur zu CO oxydiert. Je weniger Brom im Verhältnis zu Natriumhydroxyd das Reagens enthält, um so weniger weitgehend wird die Oxydierung. Bei Zusatz von Traubenzucker wird die Oxydierung noch geringer, und die entwickelte Gasmenge dadurch am größten, indem der gesamte Stickstoff frei wird, und ein größerer Teil des Kohlenstoffes in CO umgewandelt wird.

2. Durch Dekomposition von Ammoniumchlorid mit Natriumhypobromit wird ebenfalls nur ein Teil des Stickstoffs zu freiem Stickstoff und ein Teil wird zu Sauerstoffverbindungen umgewandelt. Durch Traubenzuckerzusatz wird die Stickstoffentwicklung geringer, und ein Teil des Ammoniaks wird nicht gespalten; die Gasentwicklung wird jedoch größer, indem sich

eine beträchtliche Menge CO aus dem Traubenzucker selbst bildet.

3. Harnstoffbestimmungen im Harn können auf folgende Weise vorgenommen werden: Durch Ausfällen mit Phosphorwolframsäure, Neutralisation, Zersetzung mit Bromnatron in einer Zusammensetzung aus 1 ccm Brom in 24,5 ccm 30%iger NaOH + 70 ccm Wasser. Die entwickelte Gasmenge multipliziert mit 100/96,5, gibt alsdann den Harnstoffstickstoff an. Oder Zersetzung mit Bromnatron in einer Zusammensetzung von 1 ccm Brom in 196 ccm 30%iger NaOH. Die entwickelte Gasmenge entspricht alsdann genau dem Harnstoffstickstoff.

Doppelbestimmungen an demselben Harn weichen nur ca. 1% ab.

Die nach dieser Methode bestimmte Harnstoffmenge ist niedriger als nach dem Ausfällen mit Phosphorwolframsäure, Zersetzung unter Druck («Autoklavierung») und Durchlüftung nach Folin.