

Kolorimetrische Bestimmung der Blutharnsäure.

Von

H. F. Höst.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität zu Kristiania [Prof. Dr. S. Torup].)

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1915.)

Die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Blut ist bis zu den letzten Jahren verschiedentlich auf praktische Schwierigkeiten gestoßen, deren Grund teilweise in den geringen Harnsäuremengen des Bluts gesucht werden muß und teilweise in dem hohen Gehalt des Bluts an Eiweißstoffen.

Garrod¹⁾ hat als erster Methoden zur Bestimmung der Harnsäure des Bluts angegeben, doch brachten dieselben auf Grund ihrer Ungenauigkeit wenig zuverlässige Ergebnisse. Später hat man sich zu diesem Zweck im wesentlichen der Silberfällungsmethode Salkowskis und der Kupfermethode Krügers mit den vielfachen Abänderungen, die dieselben erfuhren, bedient.

Diese beiden Methoden benötigen, um zuverlässige Ergebnisse zu zeigen, verhältnismäßig große Blutmengen — 100—200 ccm. —, und da Methoden, welche die Anwendung so großer Blutmengen bedingen, natürlich für klinischen Gebrauch nicht sehr anwendbar sind, ist unsere Kenntnis zur Blutharnsäure auch ziemlich mangelhaft.

Vor etwa zwei Jahren veröffentlichten Folin und Denis²⁾ eine kolorimetrische Methode für die Bestimmung der Harnsäure des Bluts. Das Prinzip dieser Methode ist das nämliche wie in der schon früher von mir geprüften und beschriebenen

¹⁾ Medicochirurg. Transact., Bd. XXV, S. 83; Bd. XXXVII, S. 49, berichtet in: Brugsch und Schittenhelm: «Der Nucleinstoffwechsel», S. 61.

²⁾ Journ. of biol. Chem., Bd. XIII, S. 469, Bd. XIV, S. 29.

kolorimetrischen Bestimmung der Harnsäure des Harns.¹⁾ Bei Anwendung der Methode für Blutbestimmungen wird die Harnsäure in ähnlicher Weise wie bei Salkowski isoliert, um zuletzt kolorimetrisch bestimmt zu werden. Hierdurch vermeidet man den Fehler, der meinen Untersuchungen zufolge mit der Anwendung der Methode für Harnbestimmungen verbunden ist, wo nämlich Folin und Macallum²⁾ die Harnsäure nicht isolieren, sondern dieselbe in dem eingedampften Harn bestimmen, dem nur die in Ätheralkohol löslichen Bestandteile entzogen sind.

Für die Bestimmung der Harnsäuremenge im Blut hat diese Methode vor den ehemals benutzten den erheblichen Vorteil, daß sie, außer einfacher zu sein, die Bestimmung sehr viel geringerer Mengen Harnsäure ermöglicht, so daß man nur einen Bruchteil der Blutmenge — Folin schreibt 20—25 ccm vor —, welche die obenerwähnten Methoden notgedrungen erfordern, benötigt.

Folins Methode ist später von Steinitz³⁾ und Landmann,⁴⁾ sowie von Autenrieth und Funk⁵⁾ geprüft und nach einigen geringeren Abänderungen zu Harnsäurebestimmungen im Blut (Steinitz, Autenrieth und Funk) und in Organextrakten (Landmann) als sehr brauchbar erfunden worden.

Die Folin und Denische Methode bezeichnet, falls sie sich als generell brauchbar erweisen sollte, zweifellos einen großen Fortschritt in der physiologischen und pathologischen Chemie des Bluts; da jedoch Vergleichsanalysen, außer von den Autoren selbst, nur von Steinitz und Landmann⁶⁾ zur Einsicht vorliegen, und die von diesen gewonnenen Erfahrungen und Ergebnisse in mehreren Beziehungen nicht ganz mit den

¹⁾ Zeitschrift f. klin. Med., Bd. 81, Heft 1 u. 2, S. 1.

²⁾ Journ. of biol. Chem., Bd. XIII, S. 363.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 90, S. 108.

⁴⁾ Ibidem, Bd. 92, S. 416.

⁵⁾ Münchn. Med. Wochenschr., 1914, 457.

⁶⁾ Autenrieth und Funk sprechen nur von einer vereinzelt Vergleichsanalyse, die zudem nicht sehr überzeugend wirkt, da es scheint, als habe eine Bestimmung des Harnsäuregehalts in dem Blut, dem Harnsäure zugefügt wurde, nicht stattgefunden.

von Folin und Denis¹⁾ gemachten Angaben übereinstimmen, muß es als zweckmäßig erachtet werden, die Methode einer weiteren Prüfung zu unterziehen. Ich habe deshalb Vergleichsprüfungen mit verschiedenen Sorten Blut angestellt und zwar teils mit, teils ohne Zusatz von Harnsäure, und sowohl in der anfänglichen, von Folin und Denis angegebenen Weise wie auch mit den Abänderungen, die Steinitz und Landmann vorschlagen oder die ich selbst zweckmäßig gefunden habe.

Ich werde zunächst das Verfahren, bei dem ich stehen geblieben bin, beschreiben und sodann die Einzelheiten jedes Abschnittes der Methode genau besprechen.

Methodik:

Apparate: Ein Kolorimeter mit hohen schmalen Röhren, die die Beurteilung selbst einer schwach gefärbten Flüssigkeit zulassen. Bei meinen Untersuchungen habe ich mich des Wolffschen Kolorimeters bedient mit Röhren von etwa 15 mm Durchmesser und etwa 15 cm Höhe.

Reagenzien: 1. Harnsäurelösung. 0,050 g Harnsäure werden gewogen und mit Hilfe von etwas Wasser in einen 100 ccm fassenden Maßkolben gebracht, 6 ccm 0,4%ige Lithiumcarbonatlösung hinzugetan, umgeschüttelt, in kochendes Wasserbad gesetzt und ungefähr jede $\frac{1}{2}$ Minute kräftig bis zur Lösung geschüttelt, hierzu braucht man etwa 5 Minuten; dann füllt man Wasser auf 100 ccm auf. Von dieser Lösung werden 20 ccm abgemessen und bis auf 100 ccm verdünnt. Hierdurch erhält man eine Lösung, die 0,10 mg Harnsäure in 1 ccm enthält. Die Lösung kann sich eine Woche lang halten, sollte jedoch, wie bei diesen Versuchen stets beobachtet wurde, alle 3 Tage frisch hergestellt werden. Die kurze Erhitzung im Wasserbad, wodurch die Lösung der Harnsäure erheblich gefördert wird, bewirkt keinerlei Destruktion derselben.

2. Phosphorwolframsäurelösung (Folin, Denis, Macalium). 100 g Natrium wolframicum dep. (Merck), 80 ccm 85%ige Phosphorsäure und 750 ccm Wasser werden am Rück-

¹⁾ Journ. of biol. Chem., Bd. 13, S. 469.

flußkühler 2 Stunden lang gekocht, abgekühlt, worauf man auf 1 Liter auffüllt.

Mit Absicht ist Natrium wolfram. dep. statt Natrium wolfram. puriss. pro analysi (Merck) gewählt worden, da die obige aus Natr. wolfram. dep. hergestellte Phosphorwolframsäurelösung mit Harnsäure und Alkali eine stärkere und klarere Blaufärbung gibt als die aus Natr. wolfram. puriss. pro analysi gewonnene, die bei demselben Verfahren eine mattere, graublaue, für den kolorimetrischen Vergleich nicht so geeignete Farbe gibt.

Als Reagens kann statt Phosphorwolframsäurelösung auch eine 10%ige Lösung von Phosphormolybdänsäure verwandt werden und zwar entweder mit einem weiteren Zusatz von Dinatriumphosphatlösung und folgendem Aufkochen, so wie Riegler¹⁾ es bei Harnsäurebestimmungen des Harns beobachtet und dessen auch ich²⁾ mich bedient habe, oder mit dem Zusatz eines stärkeren Alkalis, z. B. einer konzentrierten Soda-lösung ohne Erhitzung, so wie Folin und seine Schüler zur Anwendung bringen. Indessen ergibt Phosphormolybdänsäure mit Harnsäure und Alkali eine mehr grünliche und nicht so starke Blaufärbung, wie die von Folin anempfohlene Phosphorwolframsäurelösung. Der Unterschied in der Farbstärke ist jedoch nicht so groß wie von Folin³⁾ angenommen, da Phosphorwolframsäurelösung nämlich eine Farbintensität bringt, die bei der Behandlung mit gleichen Mengen Harnsäure und Alkali etwa 50% stärker ist als die durch Phosphormolybdänsäure hervorgebrachte. Dieser Unterschied spielt bei Bestimmungen im Harn, wo die Harnsäuremenge stets verhältnismäßig groß ist, keine Rolle, doch bei den kleinsten Mengen Harnsäure, mit denen man oft in einer Blutprobe zu arbeiten hat, ist der genannte Unterschied der Farbintensität von nicht geringer Bedeutung. Phosphorwolframsäurelösung in der von Folin beschriebenen Weise, ist daher bei Harnsäurekolorimetrie des Bluts der Phosphormolybdänsäurelösung vorzuziehen.

3. Formaldehydlösung. Die käufliche Formaldehydlösung («Formalin», «Formol»), die etwa 35% Formaldehyd enthält, wird mit gleichen Teilen Wasser verdünnt und mit $\frac{n}{10}$ -NaOH-Lösung neutralisiert, nachdem ihre Acidität in einer entnommenen Probe mit Phenolphthalein als Indikator bestimmt worden ist.

Es zeigte sich, daß die bei diesen Versuchen gewonnene Lösung, wenn durch das Verfahren G. Romijns⁴⁾ bestimmt,

1) Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. 51, S. 466.

2) Zeitschr. f. klin. Medizin, Bd. 81, Heft 1 und 2, S. 1.

3) Journal of biol. Chem., Bd. 13, S. 363.

4) Zeitschr. f. anal. Chemie, Bd. 36, S. 18; Bd. 39, S. 60; Bd. 43, S. 710.

13% Formaldehyd enthielt. Für die Neutralisation des mit gleichen Teilen Wassers verdünnten Formols brauchte man auf je 100 ccm Flüssigkeit 15 ccm n_{10} -NaOH-Lösung; das zur Anwendung kommende Formol enthielt demnach 33,38% Formaldehyd.

Sonstige Reagenzien, deren Zubereitung keiner besonderen Bemerkungen bedarf, kommen bei ihrer Verwendung zur Erwähnung.

Ausführung: In eine tarierte Porzellanschale, worin sich etwas (ungefähr 5 ctg) Kaliumoxalat befindet, mißt man etwa 5 ccm Blut, das gewogen wird, und zu dem man 35 ccm Wasser, 5 Tropfen 2%ige Essigsäure und 1 ccm Formaldehydlösung fügt; nach dem Umrühren Erhitzung bis zum Siedepunkt, hierauf ein weiterer Zusatz von 1 ccm 2%iger Essigsäure. Dies kocht man 3—4 Minuten und filtriert in eine andere Porzellanschale; das Gerinnsel bringt man mit einem Glasstäbchen zurück in die erste Porzellanschale, preßt es gut aus (am besten mit einem kleinen Uhrglas) und fügt 50 ccm Wasser hinzu. Nun folgt Erhitzung bis zum beginnenden Sieden, wobei man das Gerinnsel möglichst fein verteilt, Filtrierung und abermaliges Auspressen des Gerinnsels. Beide Filtrate tut man zusammen, fügt 5 ccm 50%ige Essigsäure hinzu und dampft die Flüssigkeit bis auf etwa 1 ccm ein, überführt sie in ein konisches Zentrifugenglas von etwa 10 ccm Inhalt, worauf die Schale zweimal mit 2 ccm 0,1%iger Lithiumcarbonatlösung gespült wird. Sodann füllt man in das Zentrifugenglas eine schon vorher in einem Reagenzglas hergestellte Mischung von 20 Tropfen konzentrierter Ammoniaklösung, 8 Tropfen 3%iger Silberlactatlösung und 4 Tropfen Magnesiamixtur.

Stehenlassen bis zum nächsten Tag. Man zentrifugiert, gießt die Flüssigkeit ab und wäscht den Bodensatz mit 3 ccm Wasser aus. Zum Bodensatz fügt man 6 Tropfen frisch gesättigte Schwefelwasserstofflösung, 1 Tropfen 50%ige Essigsäure und 3 ccm Wasser. Dies kocht man (im Zentrifugenglas, vorsichtig!) indem man zwischen dem jemaligen Aufkochen einen Luftstrom in das Glas leitet und zwar so lange, bis ein über die Öffnung des Glases gehaltenes Bleiacetatpapier keinen

Schimmer von Gelbfärbung mehr zeigt; dies wird gewöhnlich nach drei- bis vierminütlichem Kochen erzielt. Nun wird wiederum zentrifugiert und die Flüssigkeit in einen 25 ccm fassenden Maßzylinder gefüllt; man wäscht den Bodensatz mit 3 ccm Wasser und gießt dies in das Zylinderglas. Zur Flüssigkeit im Zylinderglas fügt man 2 ccm Phosphorwolframsäurelösung sowie 5 ccm gesättigte Sodalösung und füllt Wasser auf 25 ccm auf.

Der kolorimetrische Vergleich wird mit 1 ccm Harnsäurelösung (= 0,10 mg Harnsäure) vorgenommen, die in nämlicher Weise behandelt, gleichzeitig mit der durch Zersetzung des Silberurats entstehenden Harnsäurelösung hergestellt wird.

Während Folin und Denis 20—25 ccm Blut anwenden, ist Steinitz bis zu einer Menge von 10 ccm herabgegangen, und ich habe, wie dem Obigen zu entnehmen ist, die Verwendung von nur 5 ccm Blut bei jeder Analyse als zweckmäßig gefunden.

Es ist selbstverständlich, daß die Methode um so anwendbarer wird, je kleinere Mengen Bluts man benötigt, da die Blutuntersuchungen dann ohne Nachteil für das betreffende Individuum leichter zu wiederholten Malen ausgeführt werden können, und das Verfahren auch wegen des geringeren Waschvolumens weniger Zeit beansprucht.

Meinen Beobachtungen gemäß, die im Einklang mit denen früherer Untersucher stehen, schwankt die Harnsäuremenge im Menschenblut (bei Nicht-Arthritikern) zwischen 0,01 und 0,04‰. Durch wiederholte Untersuchungen von Rinderblut wurde dargetan, daß die Harnsäuremenge desselben ebenfalls zwischen 0,01 und 0,04‰ schwankte. Bei der Untersuchung dieser Blutsorten habe ich in 5 ccm Blut stets Harnsäure genug für eine genaue Kolorimetrie gefunden, wozu meinen Erfahrungen zufolge wenigstens 0,02—0,03 mg Harnsäure erforderlich sind; bei kleineren Harnsäuremengen wird das Ergebnis ein weniger genaues. Natürlich spielt auch das Kolorimeter hierbei eine große Rolle.

In Pferdeblut (defibriniert) habe ich größere Harnsäuremengen als frühere Autoren gefunden. Folin, der allerdings

nur einen Fall untersucht hat (*antitoxin animal*) findet 0,05 mg auf 100 g Blut, während Bass und Wiechowski¹⁾ überhaupt keine Harnsäure im Pferdeblut entdecken. Steinitz gibt an, daß Pferdeserum so gut wie harnsäurefrei sei, doch findet er im Pferdeblut 0,02‰ Harnsäure. Meine eignen Untersuchungen vom Blut mehrerer Pferde zeigen als Ergebnis 0,005 bis 0,015‰, also durchgehends weniger Harnsäure als im Menschen- und Rinderblut, aber immerhin Mengen, die sich in der Regel in 5 ccm Blut bestimmen lassen.

Zur Enteiweißung des Blutes bedienen sich Folin und Denis ausschließlich der Essigsäure, während Steinitz und Landmann, die mit Essigsäure allein keine vollständige Enteiweißung erzielen, außerdem mit Talkum arbeiten. Trotz zahlreicher Versuche ist es mir niemals gelungen, mit Essigsäure allein eine vollkommene Enteiweißung des Blutes herbeizuführen und zwar weder in der von Folin und Denis vorgeschriebenen Weise noch mit irgendeinem andern Verfahren. Eine vollkommene Enteiweißung ist indes, worauf auch Steinitz die Aufmerksamkeit lenkt, bei dieser Methode von größter Bedeutung, denn selbst kleinste Mengen Eiweiß werden den kolorimetrischen Vergleich erschweren. Ich werde später auf diesen Punkt zurückkommen.

Mit der von Steinitz vorgeschriebenen Verwendung von Talkum nach der Essigsäurebehandlung läßt sich zwar eine vollkommene Enteiweißung des Bluts herbeiführen, doch wird das Verfahren hierdurch nicht wenig erschwert, und wenn auch die Harnsäure nicht in erweisbaren Mengen zum Talkum adsorbiert, wird doch in dem ziemlich voluminösen Talkumbodensatz leicht etwas vom Filtrat zurückbleiben, das schwierig ist auszupressen, da das Talkum dann durch das Filter mitgehen kann.

Schittenhelm²⁾ hat zwecks Enteiweißung des Bluts Formaldehyd empfohlen; er benutzt dasselbe zusammen mit Kaliumphosphat, indem er von der Voraussetzung ausgeht, daß Formaldehyd die Enteiweißung fördere und gleichzeitig die Fällung von Harnsäure hindere.

¹⁾ Wien. klin. Wochenschr., 1912, S. 1863.

²⁾ Münchn. Med. Wochenschr., 1912, S. 2377.

Ehe ich mich nun mit Untersuchungen über die Bedeutung des Formaldehyds für die Enteiweißung befaßte, hielt ich es für erforderlich, die Wirkung des Formaldehyds auf Harnsäure in saurer Flüssigkeit zu untersuchen. Zu 1 ccm Harnsäurelösung (= 0,20 mg Harnsäure) wurden 20 ccm Wasser, 5 Tropfen 2^o/oige Essigsäure und 1 ccm Formaldehydlösung gefügt. Dies wurde erhitzt und beim Aufkochen 1 ccm Essigsäure hinzugegan. Nach der Eindampfung bis auf 1 ccm erfolgte die Kolorimetrie; in der Doppelanalyse fand man die gesamte zur Verwendung gekommene Harnsäure wieder.

Darauf kam der Einfluß des Formaldehyds auf die Enteiweißung des Bluts mit Essigsäure zur Untersuchung. Nach einer Reihe mit wechselnden Mengen von Essigsäure und Formol vorgenommenen Versuchen gelangte ich zuletzt zu dem oben beschriebenen Verfahren, das eine einfache und sichere Methode zum vollkommenen Gerinnen des Eiweißes darstellt. Das Filtrat ist, ohne den geringsten gelblichen Schein zu haben, so klar wie Wasser, und ebenso wasserklar hält es sich während der Eindampfung, bis es, auf ein paar Kubikzentimeter eingeschwunden, einige Salze auskrystallisieren läßt.

Das Eindampfen und die Überführung in Zentrifugengläser ist, wie ersichtlich, genau ebenso wie bei Folins Verfahren. Doch erwies es sich bei der Silberfällung als zweckmäßig, das Silberlactat, so wie Landmann vorschlägt, in Überschuß von Ammoniak hinzuzufügen, da das Silbersalz andernfalls von dem vorhandenen Formaldehyd reduziert wird, so daß metallisches Silber ausgefällt wird.

Steinitz wäscht den Silberuratbodensatz mit destilliertem Wasser aus, während Folin und Landmann ein solches Auswaschen nicht erwähnen. Da aber die über dem Uratbodensatz stehende schwach gelbliche Flüssigkeit mit dem Phosphorwolframsäurereagens und Alkali eine ziemlich starke Blaufärbung ergibt, ist ein Auswaschen des Bodensatzes zweifelsohne notwendig.

Die Zersetzung des Silberuratbodensatzes mit Schwefelwasserstoff und das Austreiben der überschüssigen Schwefelwasserstoffmenge erfolgen in etwas anderer Weise als Folin,

Steinitz und Landmann beschreiben. Die Schwierigkeit besteht darin, die Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffs leicht und bequem zu bewerkstelligen, was wegen der hohen, schmalen Zentrifugengläser nicht immer so einfach ist, während gleichzeitig vermieden werden muß, daß das Schwefelsilber in kolloidaler Gestalt ausgefällt wird, da hierdurch die Kolorimetrie sehr beeinträchtigt werden kann.

Folin und Denis fügen 4—5 Tropfen gesättigte Schwefelwasserstofflösung hinzu, sowie 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure und erhitzen dies 5—10 Minuten lang im kochenden Wasserbad; danach Hinzufügen von 1 Tropfen 0,5%iger Bleiacetatlösung und, falls starke Schwarzfärbung eintritt, abermaliges Erhitzen im Wasserbad 5—10 Minuten lang. Dies Verfahren hat sich bei meinen Versuchen nicht als zweckmäßig erwiesen, da die Flüssigkeit oft, selbst nach zweimaliger Erhitzung, deutlichen Schwefelwasserstoffgeruch verrät; zudem trifft es auch öfter ein, daß sich kolloidales Schwefelsilber bildet.

Steinitz und Landmann fügen neben Schwefelwasserstoff und Salzsäure zum Silberbodensatz bezw. 1 und 5 ccm Wasser und die Erhitzung erfolgt dann ebenfalls im kochenden Wasserbad, bei dem ersteren 10—15 Minuten, bei dem letzteren «wenigstens eine Stunde» lang. Beide prüfen zuletzt, ebenso wie Folin, die Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch das Hinzufügen von Bleiacetat.

Bediente ich mich nun bei meinen Versuchen des von Landmann vorgeschriebenen Verfahrens — des Zusatzes von 6 Tropfen Schwefelwasserstoff, 2 Tropfen Salzsäure und 5 ccm Wasser mit darauffolgender Erhitzung im kochenden Wasserbad, zeigte es sich stets, daß die Austreibung des Schwefelwasserstoffs sehr langsam vor sich ging. Selbst nach Verlauf von 2 Stunden konnte ich oft vermittelt des über die Öffnung des Glases gehaltenen Bleiacetatpapiers das Vorhandensein von Schwefelwasserstoff erkennen. Außerdem empfand ich es bei diesem Verfahren als nachteilig, daß die lange Erhitzung eine nicht geringe Verdampfung der Flüssigkeit bewirkte, und daß sich in der ziemlich stark salzsauren Flüssigkeit Schwefelsilber löste, das bei der Hinzufügung des Waschwassers kolloidal

ausgeschieden wurde, wodurch die Kolorimetrie oft unmöglich gemacht wurde.

Es ist nicht immer leicht zu beurteilen, insbesondere wenn es sich um ein so geringes wie von Folin benutztes Flüssigkeitsvolumen handelt, ob der Schwefelwasserstoff durch den Zusatz von 1 Tropfen Bleiacetatlösung völlig entfernt ist; der Silberbodensatz wird nämlich, sobald der Tropfen in die Flüssigkeit fällt, leicht aufgewirbelt werden, und unter diesen Umständen kann es sehr schwierig sein zu entscheiden, ob sich nicht etwas Bleisulfid bildet. Auch bei dem von Steinitz und Landmann vorgeschriebenen Verfahren ist das Ergebnis des Bleiacetatzusatzes nicht leicht zu erkennen, da die Flüssigkeit nach der Erhitzung im Wasserbad oft trübe ist. Will man die überschüssigen Schwefelwasserstoffmengen aus der Flüssigkeit entfernen, darf man nicht vergessen, daß die Absorption von Gasarten bei Flüssigkeiten erst dann = 0 ist, wenn dieselben kochen, während eine Flüssigkeit, die nicht köcht, selbst bei 100° — und noch mehr bei $98-99^{\circ}$ — etwas Gas absorbiert. Grundsätzlich muß es daher richtiger sein, die Flüssigkeit zu kochen, statt sie, wie die oben zitierten Autoren, nur im kochenden Wasserbad zu erhitzen. Da auch ferner starke Salzsäure, wie oben erwähnt, bei längerer Erhitzung im Wasserbad oder bei einiger Zeit des Kochens leicht etwas vom Bodensatz auflöst und dies wiederum bei der darauffolgenden Verdünnung mit dem Waschwasser kolloidal ausfällt, habe ich die Salzsäure durch Essigsäure ersetzt. Schließlich hat es sich als sehr zweckmäßig erwiesen, zwischen dem jeweiligen Aufkochen der Flüssigkeit einen Luftstrom in das Zentrifugenglas zu leiten, um den in der Luftschicht über der Flüssigkeit befindlichen Schwefelwasserstoff zu entfernen. Dies habe ich sehr einfach in der Weise bewerkstelligt, daß ich zwischen dem jeweiligen Aufkochen in das Zentrifugenglas hineinblies.

Aus diesen drei Abänderungen — dem Ersatz der Salzsäure durch Essigsäure, dem Kochen und der Entfernung des über der Flüssigkeit im Zentrifugenglas befindlichen Schwefelwasserstoffs — ergibt sich eine verhältnismäßig einfache und schnell ausführbare Methode für die vollkommene Entfernung der überschüssigen Schwefelwasserstoffmengen.

Die oben beschriebenen Abänderungen in der Folin und Denisschen Methode sind durch zahlreiche Doppelversuche am Blut von Menschen, Rindern und Pferden geprüft worden, sowie auch durch die Bestimmung der wiedergefundenen Harnsäuremengen, wenn man zu 5 ccm der genannten Blutsorten 0,05 und 0,10 mg Harnsäure fügt. Als Beispiel der durch die Kontrollanalysen gewonnenen Ergebnisse seien folgende Untersuchungen von defibriertem Blut von Rindern vor und nach dem Zusatz von Harnsäure hier angeführt. Das Blut wurde sofort, nachdem die Tiere geschlachtet waren, untersucht.

	5 ccm Blut Gef.: Harnsäure mg		Mittel- zahl	5 ccm Blut + 0,10 mg Harnsäure Gefunden: Harnsäure mg				Mittel- zahl	Wie- derge- fund. Mittel- werte %
Tier 1 . .	0,157	0,166	0,1615	0,242	0,268	0,261	0,246	0,254	92,5
• 2 . .	0,048	0,045	0,0465	0,145		0,149		0,147	100,5
• 3 . .	0,045	0,065	0,055	0,162		0,153		0,1575	102,5
• 4 . .	0,078	0,090	0,084	0,172	0,172	0,180		0,175	91

Von den hinzugefügten Harnsäuremengen werden 85 bis 100%, durchschnittlich 90—95% wiedergefunden. Ein Fehler von etwa 10% ist nicht gering, doch darf auch nicht vergessen werden, daß die absoluten Werte, um die es sich hier handelt, sehr kleine sind, denn der Verlust an Harnsäure ist in der Regel geringer als $\frac{1}{100}$ Milligramm.

Den Harnsäureverlust, mit dem man gewöhnlich zu rechnen hat, scheint man im wesentlichen der Silberfällung und den damit verbundenen Prozessen und nicht dem Gerinnungsprozeß und dem Filtrieren zuschreiben zu müssen. Ich habe mich nämlich davon überzeugt, daß man die hinzugefügte Harnsäure in denselben Mengen wiederfindet, ob der Zusatz derselben nach dem Gerinnen der Eiweißstoffe erfolgt oder ob sie dem Blut selbst beigefügt wird.

Folin und Denis, die zum Blut erheblich größere Harnsäuremengen — zwischen 0,25 und 1,2 mg schwankend — gefügt haben, finden 91—100% wieder, während Steinitz bei demselben Verfahren nur etwa 80% wiederfindet. Die abso-

luten Verluste an Harnsäure sind unter diesen Umständen natürlich bei weitem größer als die bei meinen Versuchen gefundenen.

Absichtlich sind so niedrige Harnsäuremengen bei meinen Versuchen als Zusatz gewählt worden, da nämlich die Brauchbarkeit der Methode bei Harnsäurebestimmungen so geringer Blutmengen wie 5 ccm klargelegt werden sollte; und wenn die Methode auch nicht als durchaus exakt bezeichnet werden kann, was wohl kaum der Fall mit irgendeiner der Methoden für die Bestimmung der Blutharnsäure ist, kann man doch sagen, daß ihre Ergebnisse hinreichend genau jedenfalls gegenüber den Fragen über das Verhalten der Harnsäure im Blut unter physiologischen und pathologischen Zuständen sind, die es zuerst gilt ins reine zu bringen.
