

# **Kalkstudien am Menschen.**

## **I. Mitteilung.**

### **Zur Methodik der Bestimmung des Blutkalks.**

Von

**Dr. W. H. Jansen, Assistent der Klinik.**

---

Aus der II. medizinischen Klinik der Universität München (Vorstand: Prof. Fr. Müller).

(Der Redaktion zugegangen am 29. November 1917.)

---

Bei Untersuchungen, welche ich über die Beeinflussung der Blutgerinnung durch Kalk-Extragegaben anstellte, mußte ich mein Interesse über dieses engere Gebiet hinaus auf allgemeinere Probleme des Kalkstoffwechsels ausdehnen. Das Studium dieser Fragen erschien mir um so notwendiger, als unsere Anschauungen über Kalkresorption und Kalkgewinn des Organismus bis heute nicht genügend geklärt sind, und weil ferner eine sichere Beurteilung des Blutkalkgehaltes, oder des sog. Blutkalkspiegels und seiner verschiedenen Variationen nicht möglich ist. Dies letztere findet darin seine Erklärung, daß wenige Blutkalkanalysen wegen der damit verbundenen Schwierigkeiten ausgeführt wurden. Wenn die bereits vorliegenden Analysenresultate über die Größe des Blutkalkgehalts so große Differenzen zeigen, so dürfte dies hauptsächlich an der Verschiedenartigkeit und Ungenauigkeit der angewandten Untersuchungsmethoden liegen. Ich halte deshalb einleitend eine kritische Besprechung der Blutkalkanalysen für notwendig, um so mehr als dadurch dieser oder jener Widerspruch in den Untersuchungsergebnissen der verschiedenen Autoren unter jeweiligem Hinweis auf die Fehlermöglichkeit in der Analyse geklärt werden kann. Ferner sind die meisten Analysen an pathologischen Fällen gemacht worden. Vorbedingung für eine genaue Kenntnis des Kalkgehaltes im Blute und seine durch verschiedene Einflüsse bedingte Variatio-

nen ist eine exakte Feststellung des Blutkalkgehalts an gesunden Individuen und eine systematisch durchgeführte Reihenuntersuchung an ein und demselben Individuum, das verschiedenen Bedingungen der Kalkaufnahme unterworfen worden ist.

Um einigermaßen exakte Resultate bei Untersuchungen des Blutkalks zu erzielen, sind wegen seines geringen Gehaltes 100 ccm Blut im Minimum zur chemischen Analyse notwendig. Abgesehen davon, daß bei der Verarbeitung so großer Mengen organischer Substanzen die Analyse sehr zeitraubend und mühevoll ist, wird sie in ihrer praktischen Ausführbarkeit dadurch unmöglich, daß man zu fortlaufenden Untersuchungen an demselben Individuum diesem nicht jedesmal so große Mengen Blut entziehen kann, ohne es zu schädigen.

In der richtigen Bewertung einer solchen Unmöglichkeit, am Lebenden die Variationen des Blutkalkspiegels auf diese Weise zu bestimmen, suchten in neuerer Zeit einige Forscher andere Wege zu seiner Bestimmung.

Blaire-Bell <sup>(1)</sup> zählte in der Zeiß-Thomaschen Zählkammer in einem Tropfen Blut die durch zugefügte Oxalsäure gefällten Calciumoxalatkrystalle und berechnete aus der gefundenen Zahl der Krystalle den Calciumgehalt. Diese Zählmethode kann wegen der vielen Zufälligkeiten: wie mangelhafte Ca-Fällung aus dem Blut, unregelmäßige Krystallformen, differente Krystallgrößen u. a. sicherlich keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben. Ich verweise diesbezüglich auf das Urteil von Lamers <sup>(2)</sup>, der mit dieser Methode zu arbeiten versuchte und zu dem Schluß kommt, «daß die Methode den Anforderungen der Richtigkeit, Genauigkeit und Brauchbarkeit nicht entspricht». Andere Forscher suchten aus dem biochemischen Vorgang bei der Blutgerinnung Anhaltspunkte für die vergleichende Beurteilung des Kalkgehalts im Blute zu gewinnen. So meint Weiß <sup>(3)</sup>, daß durch die Verabreichung von Kalk eine Störung der Ionen-Konzentration im Blute im Sinne einer Ca-Vermehrung eintritt, und daß diese Gleichgewichtsstörung ihren Ausdruck in einer verkürzten Gerinnungszeit findet. Die Gerinnungszeit des Blutes ist demnach ein Maßstab für seinen Kalkgehalt. Demgegenüber möchte ich einwenden, daß die Gerinnungszeit des Blutes je nach der angewandten Methode wechselt und nur Vergleichsresultate, aber kein absolutes Maß liefert, und daß die Gerinnung selbst von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Stehen sich doch in dieser Frage noch zwei prinzipiell verschiedene Auffassungen gegenüber. Nach Alex. Schmidt <sup>(4)</sup>, Morawitz <sup>(5)</sup>, Fuld

und Spiro<sup>(6)</sup> ist die Gerinnung ein fermentativer Prozeß, bei welchem ein im Blutplasma vorgebildeter, fermentartiger Körper durch aus zelligen Elementen entstehende Katalysatoren aktiviert wird, wobei Kalksalze nötig sind. Nach Woolridge<sup>(7)</sup> und Nolf<sup>(8)</sup> ist sie eine chemische Fällungsreaktion zweier, bzw. dreier kolloidaler Körper, ebenfalls in Gegenwart von Kalksalzen. Die Umkehrung des Satzes: «ohne Kalk keine Gerinnung» in das Gegenteil: «je mehr Gerinnung, desto mehr Kalk», ist nicht ohne weiteres zugänglich.

Im engsten Zusammenhang mit der Gerinnung steht eine Methode zur Bestimmung des Kalkgehalts im Blute, wie sie von Wright<sup>(9)</sup> ausgearbeitet wurde. Ihr Prinzip besteht in der Aufhebung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes durch oxalsaurer Salze. In Kapillarröhrchen werden die gleichen Quantitäten Blut aufgesaugt, mit denselben Mengen von Ammoniumoxalatlösung von aufsteigender Konzentration gemischt, und diese Mischung in Kapillaren dann der Gerinnung überlassen. Aus der Oxalatkonzentration, die gerade der Gerinnung vorbeugt, kann man mit Hilfe der Molekulargewichtsgleichung den Kalkgehalt des Blutes berechnen. Diese Methode gibt nur relative Werte, die jedoch ausreichend für vergleichende Kalkbestimmungen sein sollen.

Sie hätte, wenn dies wirklich der Fall wäre, als Mikromethode ihre Vorzüge. Soweit ich die deutsche Literatur in dieser Frage überschaue, ist diese Methode in ihrem Original nur von Cristea und Denk<sup>(10)</sup>, von Neurath<sup>(11)</sup> und von Katzenellenbogen<sup>(12)</sup> ihren Blutkalkuntersuchungen zugrunde gelegt worden. Die Ergebnisse ihrer Arbeiten beweisen aber keincswegs die Brauchbarkeit der Methode, auch nicht für vergleichende Bestimmungen. Denn um wirklich noch bemerkbare Ausschläge betreffs der Gerinnung zu sehen, müssen die Differenzen in den zugefügten Ammoniumoxalat-Konzentrationen relativ hoch gewählt werden:  $\frac{1}{600}$ ,  $\frac{1}{900}$ ,  $\frac{1}{1200}$ ,  $\frac{1}{1500}$ ,  $\frac{1}{1800}$ . Bei der letzten Konzentration bleibt das Blut meist flüssig, es beginnt erst bei  $\frac{1}{1500}$ -Konzentration deutlich die Gerinnung zu zeigen. Diese und die nun folgenden Oxalatkonzentrationen entsprechen nach der Molekulargewichtsgleichung (Ammoniumoxalat + 1 aq. = 142, CaO = 56) einem prozentualen Kalkgehalt von 26,2 mg, 32,8 mg, 43,8 mg und 65,7 mg. Gemäß den Konzentrationsdifferenzen ließen sich mithin erst Kalkwerte innerhalb der Grenzen von 6,6 mg, 11 mg und 21,9 mg CaO ermitteln. Bei dem Bestreben des Blutes, seine Ionen-Konzentration möglichst konstant zu erhalten, dürften Schwankungen von solcher Größe theoretisch kaum möglich sein. Wenn anderseits Wright<sup>(9)</sup> bei demselben Individuum unter denselben Versuchsbedingungen Schwankungen zwischen  $\frac{1}{900}$ - und  $\frac{1}{1500}$ -Konzentration = 17,6 mg CaO im Blute findet, oder Cristea und Denk<sup>(10)</sup> Schwankungen zwischen  $\frac{1}{600}$ - und  $\frac{1}{1200}$ -Konzentration = 32 mg CaO als «innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegend» ansehen, dann spricht eine solche — mit 50—100% Fehlergrenze — sich ihr eigenes Urteil.

Voorhoeve <sup>(13)</sup> nahm dann zur Erlangung besserer Resultate eine Modifikation dieser Methode vor. Er zog in eine 5 ccm fassende Spritze bis zur Hälfte Blut auf, das er durch Venenpunktion gewann, in die andere Hälfte Ammoniumoxalatlösung, die gegenüber dem Molekularäquivalent des Blutkalks bedeutend größer war. Dann fügte er diesem Gemisch aufsteigende Konzentrationen von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzu, bis die Gerinnung des Blutes eintrat. Aus dem Verbrauch an  $\text{CaCl}_2$  berechnete er dann den Kalkgehalt des Blutes. Einzelheiten besagt die Originalarbeit. Diese Modifikation hat das Wrightsche Prinzip zur Grundlage. Es wird die Gerinnung (nicht die Gerinnungszeit) gewissermaßen als Indikator für das erste Auftreten von löslichen Kalksalzen im Blute benutzt. Dies erscheint mir keineswegs angängig. Denn eine biochemisch so komplizierte Flüssigkeit wie das Blut ist nicht wie eine reine Lösung von Kalksalzen.

1. Kann man nicht, wie bei dieser, die Kalksalze durch Oxalate quantitativ fällen, und dann den Überschuß an Oxalatlösung in derselben Blutflüssigkeit durch  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gewissermaßen zurücktitrieren, um so den Blutkalkgehalt zu ermitteln.

2. Kann man den Eintritt der Gerinnung, der sicherlich an die Anwesenheit von Kalksalzen, aber außerdem noch an andere Faktoren gebunden ist, deren Wechselwirkungen untereinander wir unter solchen geänderten physikalischen-chemischen Umständen gar nicht kennen, nicht als Indikator benutzen. Ist es doch wahrscheinlich, daß das zum Oxalatblut hinzugefügte  $\text{CaCl}_2$ , aus dessen Verbrauch der Kalkgehalt des Blutes berechnet wird, die Gerinnung herbeiführen kann, ohne daß es vorher zur Fällung mit dem überschüssigen Ammoniumoxalat kommt, und ohne daß dieses quantitativ gebunden wird.

3. Kann nur der ionisierte Anteil des Blutkalks im günstigsten Fall bestimmt werden, während der gebundene Kalk unberücksichtigt bleibt, der nach Untersuchungen von Rona und Takahashi <sup>(14)</sup> 25–30% des Gesamtkalkes im Blut betragen kann.

Es spielen bei dieser Methode eben zu viele unbekannte Faktoren mit, als daß sie — wenn auch nicht absolute Zahlen — auch nur einwandfrei brauchbare Vergleichszahlen mit Sicherheit liefern könnte.

Auf diesen Wegen dürfte man also kaum zu einem befriedigenden Ergebnis kommen. Es bleibt vorerst nur die chemische Analyse als einzig sichere Möglichkeit der Bestimmung. Ich bin mir dabei bewußt, daß sie in Form der Blutaschenanalyse angewandt nur Aufschluß über den wahren Gehalt des betreffenden Mineralstoffs geben kann, uns aber nichts über die Form und Art seines Vorkommens, sei es als Salz oder Kolloid, auch nichts über seine Konzentration als Ion sagen

kann. Wohl aber dürften wir mit ihrer Hilfe mehr Einblick in die Wechselbeziehungen der Ionen untereinander gewinnen und etwas Näheres über die Bedingungen erfahren, unter welchen diese erfolgen. Bei der bisher geübten gravimetrischen Methode der Kalkbestimmung sind aber, wie schon oben bemerkt, mindestens 100 ccm Blut zur Analyse nötig. Ist doch auch dabei die Fehlergrenze immerhin noch groß genug. Bei einem mittleren Blutkalkgehalt von ungefähr 10 mg CaO würde diese, unter Berücksichtigung der unvermeidlichen Analysenfehler — wie z. B. des Wiegefehlers —, in einer Höhe von 1 mg schon bei 10% liegen. Also sind 100 ccm Blut die Mindestmenge an Analysenmaterial. Das Analysenresultat wird hierbei genauer, wenn man das CaO als großes Molekül bestimmt, wie dies z. B. Hamburger <sup>(15)</sup> in einer neueren Arbeit getan hat. Er fällte aus dem alkoholisch gemachten, salzsauren Blutascheauszug das Ca mittels verdünnter Schwefelsäure und wog es dann als CaSO<sub>4</sub>. Ich bemerke dazu, daß das CaSO<sub>4</sub> in saurer alkoholischer Flüssigkeit zum Teil löslich ist. Ferner konnte ich in einer größeren Anzahl Versuchen nachweisen, daß das Eisen in dem Salzgemisch, wie es der Blutascheauszug darstellt, zum Teil mitgerissen und im Niederschlag als CaSO<sub>4</sub> mitgewogen werden kann, wie dies Gutmann <sup>(42)</sup> und von der Heide <sup>(43)</sup> ebenfalls bestätigt haben.

Nun wies Krüger <sup>(16)</sup> nach, daß die Hempelsche Methode <sup>(17)</sup> der Kalkbestimmung durch Titration mit Normal-Kaliumpermanganatlösung gerade für kleine Kalkmengen sehr brauchbare Resultate ergibt. Seine Bestimmungen kleiner Mengen Ca von 0,995 mg bis 2,985 mg in Form von Carbonat weisen eine Fehlergrenze von nur 0,5 bis 7,87% und einen Mittelwert von nur 2,34% auf. Nach dieser Richtung angestellte Versuche veranlaßten mich jedoch nicht zur Anwendung der Methode, obwohl die Versuchsergebnisse nicht schlecht ausfielen. Eine Quantität von 10 ccm Blut erschien mir als eine im Interesse der Versuchsperson und auch in dem einer nicht allzu zeitraubenden Verarbeitung liegende, höchstzulässige Menge. Diese geringe Blutmenge enthält aber so wenig Kalk, daß er nur mit  $\frac{n}{100}$ -Permanganatlösung titriert werden konnte.

In dieser Weise haben auch in neuerer Zeit Forscher, wie Teissier, Morel und Thévenot (<sup>18</sup>), sowie Lamers (<sup>2</sup>), der bei 40—50 ccm Blut mit  $n/50$ -Permanganatlösung arbeitete, ihre Blutkalkuntersuchungen gemacht. Die Gründe, diese Methode nicht anzuwenden, waren für mich folgende:

1. war der Farbenumschlag oder die restierende Rotfärbung bei der  $n/100$ -Permanganatlösung zu inkonstant und wenig intensiv, sodaß ich immer im Zweifel war, wann das Ende der Titration erreicht, das heißt, alle Oxalsäure oxydiert war. Lamers empfiehlt bei seiner Titration mit  $n/50$ -Permanganatlösung 4 mal den Umschlagspunkt der Farbreaktion zu bestimmen und aus diesen vier Bestimmungen den Mittelwert in Rechnung zu setzen, sicherlich auch ein Zeichen der Inkonstanz und Ungenauigkeit der Reaktion.

2. Ist die  $n/100$ -Permanganatlösung zu unbeständig, sodaß eine jedesmalige Neueinstellung ihres Titers mittels einer  $n/100$ -Oxalsäure nötig wurde, was sehr mühevoll und zeitraubend ist. Dieser Unexaktheit der Titration mit Kaliumpermanganatlösung ging Aschenheim (<sup>19</sup>) dadurch aus dem Wege, daß er eine von Leegler ausgearbeitete Titrationsmethode anwandte. Nach Gewinnung des CaO aus der Blutasche, wie üblich, wird dieses in Salzsäure gelöst und dann das CaO aus dem Verbrauch an Chlor, das durch Titration gegen Silbernitratlösung bestimmt wird, berechnet. Gegen diese Chlorbestimmung und Umrechnung auf CaO läßt sich, soweit der titrimetrische Anteil in Frage kommt, nichts einwenden. Betreffs der «üblichen» Gewinnung des CaO aus der Blutasche verweise ich hier schon auf meine späteren Ausführungen.

Auf dem einmal beschrittenen Wege der Titration setzte ich meine Versuche mit der von F. R. Mohr (<sup>20</sup>) vorgeschlagenen Alkalimetrie zur Bestimmung des Kalks fort. Die bis heute in der Literatur mitgeteilten Kalkwerte im Blut schwanken zwischen ca. 3—40 mg-% CaO. Ich mußte also von einer Methode verlangen, daß sie entsprechend der oben postulierten Quantität von 10 ccm Analysenblut einen Gehalt von 0,3 bis 4,0 mg CaO ohne allzuweite Fehlergrenze noch ermitteln ließ. Theoretisch betrachtet, mußte die Alkalimetrie diese Forderung

erfüllen, wenn die Normallösung nur hinreichend verdünnt wurde und der Indikator fein und scharf genug war. Ich wählte zu diesem Zwecke exakt stimmende  $n/100$ -Natronlauge und  $n/100$ -Salzsäure, deren jede auf 500 ccm einen Zusatz von 15 Tropfen alkalisch gesättigter Lösung von Dimethylamidoazobenzol-o-Carbonsäure (Methylrot) erhielt. Ein Umschlag von Rot in Gelb trat nach erfolgter Neutralisation schon bei einem Tropfen der Lösung exakt und deutlich sichtbar auf. Im folgenden bringe ich in Form von Tabellen eine Anzahl von Blindversuchen, an denen man am besten den Wert der Methode beurteilen kann.

Es wurden 620 mg des bis zur Gewichtskonstanz geglühten CaO in 500 ccm  $n/10$ -Salzsäure gelöst. Von dieser salzsauren CaO-Lösung wurden 50 ccm auf ihren CaO-Gehalt erst titrimetrisch bestimmt. Für 1 ccm salzsaurer CaO-Lösung ergaben sich hierbei folgende Werte:

1 ccm CaO-Lösung = 1,24 mg gravimetrisch,

1 ccm CaO-Lösung = 1,232 mg titrimetrisch.

Bestimmte Mengen dieser Lösung wurden ammoniakalisch gemacht, in der Siedehitze auf dem Wasserbad mit siedender, kalt gesättigter Ammonoxalatlösung versetzt, 6—10 Stunden auf dem Wasserbad stehen gelassen, der Niederschlag abfiltriert und samt dem Filter verascht und in der Weißglut 15 Minuten geglüht. Der so erhaltene reine Kalk wurde nach dem Prinzip der Alkalimetrie weiter behandelt. Die Resultate zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1.

Angewandte Mengen		Gefundene Mengen	Beleg ( $1/100$ Titer)	
ccm der Lösung = CaO			Säureverbr.	Konstant
ccm	mg	CaO		
	mg	mg		
$1/2$	0,62	0,616	2,2	0,28
1	1,24	1,232	4,4	0,28
2	2,48	2,492	8,9	0,28
$3 1/2$	4,34	4,34	15,5	0,28

Diese Versuche zeigen, daß Werte von 0,62 bis 4,34 mg CaO mit einem hohen Grad von Genauigkeit mittels der Alkalimetrie wiedergefunden werden können.

Es ergibt sich nun die weitere wichtige Frage, wie man aus dem Blut das CaO rein und quantitativ gewinnen kann. Von den im Blut befindlichen übrigen Mineralstoffen werden O, CO<sub>2</sub>, Cl, Na und K durch starkes Glühen zum großen Teil verflüchtigt. Es bleiben im salzsauren Auszug der Blutasche hauptsächlich nur Kalk, Magnesia, Eisen und Phosphorsäure. Zur quantitativen Fällung des Kalks ist die Entfernung der beiden letzteren unbedingt notwendig. Es sind für diesen Zweck in den Lehrbüchern und den einschlägigen Arbeiten verschiedene Methoden und Variationen innerhalb dieser zur Erzielung exakter Resultate beschrieben worden, die ich im folgenden kurz kritisch besprechen will.

So entfernt Verdeil<sup>(21)</sup> aus dem salzsauren Ascheauszug durch Schwefelammonium erst das Eisen, bestimmt dann das Ca als Phosphat und rechnet in CaO um. Schmidt<sup>(22)</sup> fällt durch Ammoniak die Gesamtmengen der Kalk- und Magnesiaphosphate, die er dann in Salzsäure wieder löst. Aus dieser brachte er alsdann durch Zufügen von Natriumacetat das Eisen als Eisenphosphat heraus, um in dem nun essigsäuren Filtrat durch Oxalatsalz den Kalk zu fällen. Auf diese Weise konnte er das gegenseitige Verhältnis der Erdphosphate berechnen. Die Phosphorsäure des Blutes wird bei diesem Verfahren zum größten Teil an das Eisen gebunden und dürfte meines Erachtens nicht mehr zur Bindung sämtlicher alkalischer Erden im Blute ausreichen, sodaß deren Gehalt als zu niedrig gefunden werden muß.

Moraczewska<sup>(23)</sup> entfernt zuerst die Phosphorsäure durch Molybdänsäure und fällt aus dem neutralisierten, mit Essigsäure angesäuerten Filtrat durch Oxalat den Kalk. Dies erscheint mir schon deshalb nicht angängig, weil in Gegenwart des Überschusses an Molybdänsäure der Kalk nicht quantitativ ausfällt.

Andere Forscher, wie Jarisch<sup>(24)</sup>, Landsteiner<sup>(25)</sup> schieden Eisen- und Phosphorsäure mittels Ammoniak als basisch phosphorsaures Eisen aus der salzsauren Lösung ab. (Vergl. Treadwell<sup>(26)</sup>). Dabei bilden sich auch Calciumphosphate, die mit dem Niederschlag abfiltriert werden. Wiederholtes Umfällen dieses Niederschlags verringert zwar die Bildung von Calciumphosphaten und verbessert also das Analysenresultat, vermag aber den Fehler nicht vollständig zu beheben.

Um die Phosphatbildung der Erdalkalien in der ammoniakalischen Lösung zu vermeiden, oder die gebildeten Phosphate selbst wieder zu

lösen, fügt man Essigsäure bis zur sauren Reaktion hinzu und fällt aus essigsaurer Lösung Eisen-Phosphorsäure mit Ammoniumacetat als basisch-essigsäures Eisenphosphat. Nach diesem Verfahren haben Dennstedt und Rumpf (<sup>27</sup>), Hirschler und Terray (<sup>28</sup>), Proskauer (<sup>29</sup>) u. a. ihre Blutkalkbestimmungen ausgeführt. Um möglichst sämtliche Phosphorsäure mit zu entfernen, empfiehlt Aron (<sup>30</sup>) den Zusatz von 5–10 ccm einer 10%igen Eisenchloridlösung. Diese Methode der Ca-Bestimmung mit und ohne Eisen-Zusatz findet sich in den meisten Lehr- und Handbüchern der analytischen Chemie der neueren Zeit, und wenn man in den einschlägigen Kalkarbeiten betr. der angewandten Methodik liest, «wie üblich» oder «in üblicher Weise», so darf man dieses «üblich» wohl auf diese beschriebene Methode beziehen. Ich zitiere als Belege hierfür Rey (<sup>31</sup>), Allers und Bondi (<sup>32</sup>), Rona und Takahachi (<sup>14</sup>), Aschenheim (<sup>19</sup>). Diese «übliche» Methode habe ich in Form von Blindversuchen ebenfalls einer Prüfung unterzogen. Die Ergebnisse meiner Analysen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2.

Nr.	Angewandte Mengen				Gefundene Mengen CaO mg	Differenz absol. mg
	ccm = CaO		Fe <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		
	ccm	mg	mg	mg		
1.	0,5	0,62	20	2	0,616	— 0,004
2.	0,6	0,74	20	2	0,73	— 0,01
3.	0,7	0,85	20	2	0,84	— 0,01
4.	1	1,24	100	10	0,78	— 0,46
5.	2	2,48	100	10	2,48	+ 0
6.	3	3,72	100	10	3,45	— 0,27

Die Analysenresultate zeigen einen hohen Grad von Genauigkeit, wenn man von den Analysen Nr. 4 und Nr. 6 absieht. Diese einfach mit einem Analysenfehler zu entschuldigen, geht nicht an, da sich im Eisenphosphatniederschlag Kalk nachweisen ließ. Zahlreiche andere Analysen dieser Art, die ich im Anschluß daran ausführte, und deren Ergebnisse ich nicht alle zahlenmäßig mitteilen will, zeigen bisweilen dieselbe Erscheinung. Desgleichen führte ich 12 Analysen mit Menschenblut nach dieser Art aus und fand dabei Kalkwerte, die zwischen 4,5 mg % und 12,6 mg % CaO schwankten. Der Mittelwert lag bei 7,4 mg % CaO. Obwohl ich diese Werte für den Blutkalkspiegel in der Literatur immer wieder bestätigt finde, zog ich auf Grund der an den Blindversuchen gemachten Erfahrung die Richtigkeit dieser Werte in Zweifel und prüfte den Eisenphosphatniederschlag auf etwaigen Kalkgehalt. Dabei konnte

ich in den meisten Fällen, bei denen der Kalkgehalt niedriger als 9 mg % CaO war, stets mehr oder weniger Kalk nachweisen. Bei einem Kalkgehalt von 10 mg % und aufwärts war der Niederschlag kalkfrei. Diese Tatsache machte ich zum Ausgangspunkt weiterer Studien in dieser Richtung. Ich konnte dabei nachweisen, daß sich bei der Neutralisation der salzsauren Lösung mit Ammoniak in dem entstehenden ersten Niederschlag außer dem Eisenphosphat auch kleine Mengen von Erdalkaliphosphaten bildeten, von denen sich auf Zusatz von Essigsäure ein Teil unter bestimmten, mir unbekanntem Bedingungen nicht löste und dann mit abfiltriert wurde. So erklärt sich die Differenz in den wiedergefundenen Mengen der Tabelle 5. Die Entfernung kleiner Mengen Calcium mit dem Eisen und der Phosphorsäure kann verschiedene Ursachen haben. Einmal kann mit dem starken Präzipitieren der Eisenphosphate das Calcium mitgerissen und von dem Eisensalz eingeschlossen werden, sodaß es später in der schwach essigsäuren Lösung unlöslich wird. Dann kann das Calcium mit der Phosphorsäure als dreibasische Säure verschieden basische Salze bilden, von denen das zweibasische, also Dicalciumphosphat, in Essigsäure fast unlöslich ist.

Handelt es sich vielleicht bei dem im Niederschlag befindlichen Calcium um das sekundäre Salz? Ich konnte bei qualitativen Versuchen in solchen Fällen, wo ein in Essigsäure unlösliches Calciumphosphat sich bildete, dieses durch Zusatz von Ammoniumcitrat in Lösung bringen. Demnach dürfte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das Dicalciumphosphat handeln. Ich wiederhole ausdrücklich, daß man u. U. das Calcium mitentfernen kann, nicht immer muß, wie das ja aus Tabelle 5 auch klar ersichtlich ist. Immerhin habe ich nachgewiesen, daß in der «üblichen Methode» eine Fehlermöglichkeit liegt.

Diese Fehlermöglichkeit wird ausgeschaltet, wenn man, wie Hoppe-Seyler<sup>(33)</sup> in seinem Handbuch angibt, die salzsaure Lösung durch Natriumcarbonat bis zur schwach sauren Reaktion abstumpft, ohne daß, wie Fresenius<sup>(34)</sup> ausdrücklich hervorhebt, ein bleibender Niederschlag entstanden sein darf, und dann mit Natriumacetat Eisen und Phosphorsäure entfernt. Nach diesem Prinzip haben mit geringen Variationen Bunge<sup>(35)</sup>, Abderhalden<sup>(36)</sup> ihre Blutkalkuntersuchungen ausgeführt. Folgende Blindversuche geben am besten einen Maßstab für die Beurteilung der Methode ab (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3.

Nr.	Angewandte Menge			Gefundene Menge CaO mg	Differenz absol. mg	Beleg ( $\frac{1}{100}$ Titer) Verbr. Säure ( $\times 0,28$ ) ccm	
	ccm = CaO ccm	mg	Fe <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> mg				P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg
1.	0,5	0,62	120	8	0,62	$\pm 0$	2,2
2.	1	1,24	120	8	1,24	$\pm 0$	4,45
3.	2	2,48	140	8	2,49	- 0,01	8,9
4.	3	3,72	140	12	3,75	+ 0,03	13,4
5.	3,5	4,34	200	16	4,34	$\pm 0$	15,5

Diese Versuche beweisen überzeugend, daß man aus einer salzsauren Lösung, die Eisen und Phosphorsäure enthält, den Kalk exakt quantitativ bestimmen kann. Somit sind durch sie die Grundlagen geschaffen, auf denen fußend ich nunmehr an die Blutkalkbestimmungen mit einem sicheren Maßstab für ihre Richtigkeit und Exaktheit herantreten konnte.

Eine Blutmenge von 10—12 ccm wurde durch Venenpunktion der Versuchsperson entnommen, in ein mit Natriumcitrat in feinsten Verteilung ausgekleidetes Reagenzrohr aufgefangen und dieses dann kräftig geschüttelt. Durch das Natriumcitrat in feinsten Verteilung gelingt es vollkommen, der Gerinnung des Blutes vorzubeugen. Von diesem Citratblut wurden mittels einer exakt ausgewogenen Pipette 10 ccm zur weiteren Verarbeitung abgemessen. Ich wählte das gesamte Blut zur Kalkbestimmung, weil es mir auf die Gesamtmenge des Blutkalks, nicht auf seine Verteilung auf Plasma und Blutkörperchen ankam. Die pipettierten 10 ccm Citratblut wurden in einer weiten Platinschale auf dem Wasserbade bis zur vollkommenen Trockenheit eingedampft, dann bei allmählich stärker werdender Bunsenbrennerflamme verkohlt und die verkohlte Masse bis zur Asche stark geglüht. Der beschriebene Prozeß ist wegen der geringen Blutmenge einfach, wenig zeitraubend und nicht mühevoll. Das starke Glühen schadet dem Kalk nichts, da flüchtige Calciumsalze nicht bekannt sind.

Das starke Glühen erfordert unbedingt Platininstrumente, denn bei allen andern, wie solchen aus Porzellan und Quarz, wird besonders durch Eisen-Phosphorsäure die Glasur angegriffen, und diese sintert mit der Asche zu einer selbst in konzentrierter Salzsäure unlöslichen Masse zusammen.

Die mit verdünnter Salzsäure (1 : 1) aufgenommene Asche wird auf dem Wasserbad im Becherglas auf ca. 5 ccm eingedampft und mit Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft. Es darf hierbei kein Niederschlag entstehen, ein bereits entstandener muß in Salzsäure wieder gelöst werden. Dann erst setzt man zu der schwach sauren Lösung 3—4 ccm einer 5%igen  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$ -Lösung hinzu, um mit Sicherheit sämtliche Phosphorsäure zu binden. Ein vor der Abstumpfung mit Ammoniak erfolgter Zusatz von Eisenchlorid erschwert unter Umständen wegen der leichten Bildung von Eisenphosphat die Neutralisation insofern, als dieses sich erst in stärkerer salzsaurer Lösung wieder lösen läßt. Dieses Produkt wird dann in der Kälte mit 3—5 ccm einer 50%igen Ammonacetatlösung versetzt und durch kurzes Aufkochen das Eisen aus der schwach salzsauren Lösung als basisch essigsaures Eisenphosphat gefällt. Die siedend heiße Flüssigkeit wird dann durch ein 9 cm-Filter (Schleicher und Schüll Nr. 2589) in ein 100 ccm fassendes Becherglas filtriert, und der Niederschlag mit ammonacetathaltigem Wasser gründlich gewaschen. Es ist darauf zu achten, daß der Eisenphosphatniederschlag nicht trocken wird, weil dann bei neuerlichem Waschen das Eisen in Lösung geht und durch das Filter läuft.

Bei Befolgung der gegebenen Vorschrift, insbesondere über die Mengenverhältnisse der Zusätze, gelingt es fast immer, das Eisen und die Phosphorsäure durch die erste Fällung völlig zu entfernen und eine etwa notwendig werdende Wiederfällung aus dem Filtrat zu vermeiden. Eine wiederholte Fällung stellt bei Verarbeitung so geringer Mengen immer eine nicht unwesentliche Fehlerquelle bei der Kalkbestimmung dar. Das Filtrat wird mit Ammoniak im Überschuß versetzt und auf etwa 10 ccm eingedampft, wobei sich bei gelungener Fällung kein rotbrauner Eisenphosphatniederschlag mehr bilden darf. Bildet sich ein solcher, so muß er abfiltriert und wie oben gründlich

gewaschen werden. Das eingeeengte Filtrat spült man in eine ca. 50 ccm fassende Krystallschale.

Jetzt wird zunächst der Eisenphosphatniederschlag gewissermaßen zur Kontrolle der ganzen Analyse auf etwaigen Kalkgehalt geprüft. Zu diesem Zweck löst man ihn völlig in Salzsäure und fügt Ammoniak im Überschuß hinzu; der gebildete rotbraune Niederschlag von ammoniakalischem Eisenphosphat wird in konzentrierter Oxalsäure gelöst. Die grünlich-gelbe, opalisierende Lösung muß dann völlig blank und klar bleiben. Die Anwesenheit einer Spur Ca verursacht in ihr eine feine Trübung. Um letzteres besser wahrnehmbar zu machen, gebrauchte ich eine in einem geschlossenen Reagenzrohr befindliche, sicher kalkfreie Lösung von entsprechender Färbung zum Vergleich. Ich habe empirisch feststellen können, daß auf diese Weise ein qualitativer Kalknachweis bis auf 0,05 mg CaO möglich ist. Zeigt sich bei der Kontrolle eine solche Trübung, so ist die Analyse unbrauchbar.

Die in der Krystallschale befindliche Flüssigkeit enthält außer dem Ca auch noch Magnesium in Lösung. Über die quantitative Trennung des Ca vom Mg hat Richards<sup>(37)</sup> gelehrt, daß man für eine möglichst schwache Dissoziation des für die Ca-Fällung notwendigen Ammonoxalates in der Lösung sorgen muß, was am besten durch Zusatz des leicht dissoziierbaren Ammonchlorids erreicht wird. Dieses befindet sich aber auf Grund der Neutralisation der Salzsäure durch Ammoniak in der vorliegenden Flüssigkeit. Indessen reichert man es durch Zusatz von 10 ccm 10%ige Ammonchloridlösung an, fügt Ammoniak hinzu und läßt letzteres langsam auf dem Wasserbad bis zur Neutralisation der Lösung abdampfen. Zu dieser siedenden Lösung setzt man 20 ccm kochende, kalt gesättigte Ammonoxalatlösung hinzu, läßt 4—6 Stunden in der Siedehitze stehen und filtriert den Calciumoxalatniederschlag durch ein 7 cm-Filter (Schleicher und Schüll Nr. 589) ab, wobei man den Niederschlag gründlich mit ammonoxalathaltigem Wasser wäscht. Filter mit Niederschlag verbrennt man dann in feuchtem Zustande in einem Platintiegel und glüht danach im Gebläse zu CaO. Das schneeweiße, amorphe CaO-Pulver wird dann sorgsam in ein Becherglas gespült, in welchem man vorher 15—30 ccm  $n_{100}$ -Salzsäure vorgelegt hat. Das Becherglas bleibt für 1—2 Stunden auf dem Wasserbade, bis sämtliches CaO

gelöst ist. Dann wird der Kalk nach oben beschriebenem Prinzip der Alkalimetrie bestimmt.

In Tabelle 4 teile ich die nach dieser Methode erhaltenen Ergebnisse von Kontrollanalysen zweier menschlicher Aderlaßblute mit.

Tabelle 4.

Nr.	1. Blut ccm	absol. CaO-Gehalt mg	CaO mg %	Beleg
1.	10	1,26	12,6	4,5 × 0,28
2.	10	1,232	12,32	4,4 × 0,28
	2. Blut			
3.	10	0,994	9,94	3,55 × 0,28
4.	10	0,98	9,8	3,5 × 0,28
5.	10	0,994	9,94	3,55 × 0,28

Trotz der Übereinstimmung der Blutkalkwerte in den Kontrollanalysen braucht diese noch kein Beweis für die Richtigkeit einer Analyse zu sein. Um aber diesem Zweifel zu begegnen, habe ich dem Blut Nr. 2 der Tabelle 4 bekannte Mengen von Kalk vorher zugesetzt und es dann erst der Analyse unterworfen. Die zugesetzten Mengen Kalk wählte ich verschieden groß, um bei dieser Gelegenheit auch zahlenmäßig den Grad der Genauigkeit der Methode zu bestimmen. Tabelle 5 gibt darüber Aufschluß. 10 ccm Blut Nr. 2 enthalten 0,994 mg CaO (vgl. Tab. 4). Hinzugefügt wurden verschieden große Mengen der früheren Kalklösung (vgl. S. 182) entsprechend einem bekannten Kalkgehalt, der aus der betreffenden Kolumne der Tabelle 5 ersichtlich ist. Die gefundenen Mengen Kalk in der Tabelle entsprechen jedesmal der Summe aus Blutkalk und Zusatzkalk.

Tabelle 5.

Nr.	Angewandte Menge			Gefundene Menge CaO mg	Differenz absol. mg	Beleg ( $\frac{1}{100}$ Titer) Verbr. Säure ( $\times 0,28$ ) ccm
	2. Blut ccm	+ Kalk- lösung ccm	= CaO mg			
1.	10	—	—	0,994	—	3,55
2.	10	0,1	0,124	1,12	+ 0,002	4,0
3.	10	0,5	1,62	1,624	+ 0,01	5,8
4.	10	0,9	1,116	2,10	— 0,01	7,5
5.	10	1,0	1,24	2,24	+ 0,01	8,0
6.	10	2,5	3,1	4,06	— 0,03	14,5

Die Analysen der Tabelle 5 beweisen, daß der gesamte im Blut befindliche Kalk wieder gefunden wird. Ferner besagen sie, daß variable Differenzen in Blutkalkgehalt bis zu einem Minimum von 0,124 mg herab exakt ermittelt werden, d. h. Schwankungen im Blutkalkspiegel um etwa 10% stellen eine mit dieser Methode noch wirklich meßbare Größe dar. Ich habe diese Arbeitsmethode meinen Blutkalk- und Kalkstoffwechseluntersuchungen zugrunde gelegt.

Der Vollständigkeit halber möchte ich an dieser Stelle noch die Kalkanalysen von Erben<sup>(38)</sup> erwähnen, der nach der Methode von Bunsen<sup>(39)</sup> arbeitete. Diese erfordert 7—10 g Asche, eine Menge, die in vivo an Blut nicht zu erhalten ist. In neuester Zeit berichtet Kehrler<sup>(40)</sup> über zahlreiche Blutkalkanalysen, die nach «außerordentlich genauer und verlässlicher Methode bestimmt» wurden, ohne indessen näheres über diese selbst zu sagen.

Zum Schluß möchte ich zur Vermeidung von bisher noch nicht erwähnten Fehlermöglichkeiten einige Leitsätze zur Technik der Analysen aufstellen:

1. Nur bei üblicher Zimmertemperatur ausgewogene Pipetten und Büretten gebrauchen.
2. Nur mit Platingefäßen arbeiten.
3. Sämtliches bei der Analyse gebrauchte Wasser muß frisch destilliert werden, sämtliche Chemikalien müssen frei von Kalksalzen sein.
4. Glasgefäße dürfen kein Alkali abgeben, weshalb Jenenser Glas zu gebrauchen ist.
5. Normallösungen müssen exakt eingestellt sein.

**Nachtrag.**

Im letzten Jahre habe ich zur Kalkbestimmung statt der Alkalimetrie die Jodometrie vielfach angewandt. Nach Kjeldahls<sup>(41)</sup> Vorschriften muß man bei ihr eine konstante Flüssigkeitsmenge mit konstanten Mengen von Jodid und Jodat und dieselbe Titrierungszeit anwenden. Ihr Prinzip beruht darin, daß die durch das CaO nicht gebundene Säuremenge die entsprechende Jodmenge in Freiheit setzt, welche dann durch Titration mit Thiosulfatlösung bestimmt wird. Haben die Titriersäure und Thiosulfatlösung dieselbe Konzentration, so entspricht die Differenz aus beiden der durch den Kalk gebundenen Säuremenge, welche mit 0,28 zur Ermittlung des Kalkgehaltes multipliziert werden muß. Es gestaltet sich hierbei die Arbeitsmethodik folgenderweise: Das in 15 ccm  $n/100$ -Salzsäure auf dem Wasserbad gelöste CaO wird in der Kälte mit 25 ccm frisch destillierten Wassers versetzt, alsdann werden 2 ccm einer 10%igen Kaliumjodidlösung und 4 Tropfen einer 4%igen Kaliumjodatlösung und 2 Tropfen einer 1%igen Stärkelösung hinzugefügt. (Letztere wird zwecks Haltbarkeit mit 20%iger Kaliumchloridlösung hergestellt.) Es erfolgt dann die Titration mit  $n/100$ -Thiosulfatlösung, bis die Blaufärbung verschwindet.

**Literatur.**

1. Blair-Bell, The Brit. med. Journ., April 1907.
2. Lamers, Zeitschr. f. Geb. u. Gyn., Bd. 71 (1912).
3. Weiß, Wien. Klin. Wochenschr. 1910, Nr. 23.
4. Al. Schmidt, Zur Blutlehre, Leipzig 1892, Wiesb. 1895.
5. Morawitz, Chem. d. Blutger. Erg. d. Physiol., IV., 1905.
6. Fuld und Spiro, Hoffmeisters Beitr., Bd. V, 1904.
7. Woolridge, Die Gerinnung des Bluts, Leipzig 1891.
8. Nolf, Arch. internat. de Physiol., H. I, 1908.
9. Wright und Knapp, Lancet, 1902, 6. Dez. Wright und Paramore, Lancet, 1905, 14. Okt.
10. Christea und Denk, Wien. klin. Wochenschr. 1910, Nr. 7.
11. Neurath, Zeitschr. f. Kinderheilk., Bd. 1, 1910.
12. Katzenellenbogen, Zeitschr. f. Kinderheilk., Orig.-Bd. 8, 1913.
13. Voorhoeve, Biochem. Zeitschr., Bd. 30, 1911.
14. Rona und Takahashi, Biochem. Zeitschr., Bd. 31, 1911.
15. Hamburger, Zeitschr. f. physikal. Chem., Bd. 69, 1909.

16. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 16, 1892.
  17. Hөmpel, Fresenius, Quant. Anal., Bd. 1, S. 238.
  18. Teissier Mersel et Thévenaut, Recherches sur la teneur en calc. du sang humain. Paris 1908.
  19. Aschenheim, Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 79, 1914.
  20. Mohr, Fr., Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 129, 1886.
  21. Vordeil, Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 69, 1849.
  22. Schmidt, C., Charakteristik d. epidem. Cholera. Leipzig 1850.
- S. 30—34.
23. Moraczewska, Virchow-Archiv, Bd. 145.
  24. Jarisch, Wien. med. Jahrb., 1871, S. 435; 1877, S. 39.
  25. Landsteiner, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 16, 1892.
  26. Treadwell, Anal. Chem., Bd. 2, S. 339, 1907.
  27. Dennstedt und Rumpf, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 41.
  28. Hirschler und Terray, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 57, 1905.
  29. Proskauer, Arch. f. Kinderheilk., Bd. 54, 1910.
  30. Aron, Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth., Bd. 1, S. 405, 1910.
  31. Rey, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 35, 1895.
  32. Allers und Bondi, Biochem. Zeitschr., Bd. 6, 1907.
  33. Hoppe-Seyler, Handb. d. phys.-chem. Anal., 1893.
  34. Fresenius, Quant. chem. Anal., Bd. 1, S. 590, 1905.
  35. Bunge, Zeitschr. f. Biol., Bd. 12, 1876.
  36. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 23 u. 25, 1897/98.
  37. Richards, Zeitschr. f. anorg. Chem., Bd. 28, 1901.
  38. Erben, Zeitschr. f. Heilkunde, Bd. 26, 1905.
  39. Bunsen, Anleitung z. Anal. d. Aschen in ges. Abhandl. v. R. Bunsen, Bd. 3, Leipzig 1904.
  40. Kehler, Verhandlg. d. deutsch. Ges. f. Gyn., Bd. 15, II. Teil, 1913.
  41. Kjeldahl, Meddelelser fra Carlsberglaboratoriet, 2, 197, 1888.
  42. Gutmann, Biochem. Zeitschr., Bd. 58, S. 470, 1914.
  43. R. von der Heide, Biochem. Zeitschr., Bd. 65, S. 363, 1914.

### Mittellung.

Mit Genehmigung der zuständigen Behörde führe ich von jetzt ab den Familiennamen Kestner.

Professor Dr. Otto Cohnheim  
Hamburg-Eppendorf.