

Über Reststickstoffbestimmung im Blutserum.

Von

Oberapotheker Dr. Fischer.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut des städtischen Krankenhauses Nürnberg
[Direktor: Prof. Dr. Johannes Müller].)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Mai 1918.)

Unter Reststickstoff im Blute oder im Blutserum versteht man im allgemeinen den Stickstoffgehalt des enteiweißten Serums. In der Hauptsache wird sich dieser Stickstoff zusammensetzen aus dem Stickstoff vor allem des Harnstoffs, dann der Harnsäure, des Kreatinins, des Indikans und der Albumosen. Je höher daher der Gehalt dieser Stoffe, besonders des Harnstoffs, im Blute ist, desto höhere Resultate wird eine Reststickstoffbestimmung ergeben.

Die Werte, die man im normalen Blutserum für Reststickstoff gefunden hat, sind relativ gering, sie betragen pro 100 ccm Serum 20—40 mg (1,5—2,5% des Serum-Gesamtstickstoffs). Auch die Erhöhungen, welche sich bei verschiedenen Erkrankungen einstellen, geben im Verhältnis zum Gesamtstickstoff des Blutes keine allzuhohen Werte. Jedenfalls können schon geringe Fehler bei der Ausführung der Bestimmung zu großen Täuschungen hinsichtlich der Beurteilung des Zustandes eines Patienten Veranlassung geben.

Da nun die Methode der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl eine äußerst exakte Bestimmung des Stickstoffs gewährleistet, habe ich mein Hauptaugenmerk auf die richtige Art der Enteiweißung geworfen, zumal ich einmal bei einer solchen Bestimmung einen viel zu hohen Wert erhielt, welcher durch die Enteiweißung mittels Liquor Ferri dialysati bedingt war, trotzdem genau nach Vorschrift gearbeitet worden war. In den meisten Büchern über physiologisch-chemische Unter-

suchungen sind merkwürdigerweise über die Reststickstoffbestimmung im Blute sehr wenig Angaben enthalten. Ich habe es daher unternommen, die wichtigsten Enteiweißungsmethoden auf ihre Gebrauchsfähigkeit bei der Reststickstoffbestimmung hin zu prüfen.

Es kommen für diesen Zweck schließlich alle Fällungsmethoden des Eiweißes in Betracht. Nach kurzen Vorversuchen habe ich mich auf folgende drei Methoden beschränkt, da dadurch eine vollkommene Beantwortung der schwebenden Frage erfolgt.

1. Die Fällung mittels Liquor Ferri dialysati nach Rona und Michaelis.

2. Die Fällung mittels essigsaurer Chlornatriumlösung.

3. Die Fällung mittels essigsaurer Natriumacetatlösung nach der von Authenrieth und Funk bei der kolorimetrischen Bestimmung der Harnsäure benutzten Methode.¹⁾

ad 1. Für die Fällung mit Liquor Ferri dialysati lauten die Vorschriften hinsichtlich der Menge des zuzusetzenden Liquors verschieden. Die ursprüngliche Vorschrift von Rona und Michaelis²⁾ ist folgende: «50 ccm Serum oder Plasma werden auf das 10—12fache verdünnt und mit 40 ccm Liquor Ferri dialysati tropfenweise unter lebhaftem Umschütteln versetzt. Damit ist die Enteiweißung vollendet.» Ivar Bang³⁾ gibt folgende Vorschrift für das gleiche Verfahren an: 30 bis 50 ccm Blut werden mit Wasser auf 1 Liter verdünnt. Man setzt unter Umschütteln auf je 1 g Blut 2,5—3 ccm Liquor Ferri oxydati dialysati hinzu. Die Mischung läßt man unter zeitweiligem heftigen Schütteln etwa 10 Minuten stehen, dann setzt man ihr fein gepulvertes Magnesiumsulfat auf einmal hinzu und schüttelt 1—2 Minuten. Man filtriert und erhält so eventuell schon ein eiweißfreies Filtrat, doch bleibt oft noch etwas Hämoglobin zurück, das dann durch weiteren Zusatz von Eisenlösung entfernt werden kann.

¹⁾ Münch. med. Wochenschr., Bd. 61, S. 457 (1914).

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 332 (1907).

³⁾ I. Bang, Der Blutzucker, S. 13.

An anderer Stelle¹⁾ wird die Methode von Michaelis und Rona für die Enteiweißung zwecks Zuckerbestimmung im Blut folgendermaßen angegeben: 30—40 g Blut werden mit Wasser auf 1 Liter verdünnt und hierzu etwa 3 ccm Eisenlösung gegeben. Nach 10 Minuten setzt man 1—1,5 g Magnesiumsulfat in Substanz hinzu, schüttelt 1—2 Minuten und filtriert, das Filtrat wird bei schwach saurer Reaktion stark konzentriert.

Ich habe alle diese Methoden, deren Verschiedenheit im wesentlichen auf dem mehr oder weniger großen Zusatz von Eisenlösung beruht, mit Blutserum, dem ich eine bestimmte Menge einer genau eingestellten, durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nachgeprüften Harnstofflösung zusetzte, genau geprüft und gefunden, daß die beste Methode die zuerst angegebene ist. Aber auch bei dieser ist es mir nicht in allen Fällen gelungen, völlige Enteiweißung zu erreichen. Wenn ich einem Blutserum mit bekanntem Reststickstoffgehalt bestimmte Harnstoffmengen zusetzte, habe ich nur äußerst selten die zugesetzten Mengen genau wiedergefunden. Trotzdem stets in gleicher Weise gearbeitet wurde, erhielt ich nur bei einigen Serien sehr gute Resultate, bei den meisten jedoch zu hohe Werte. Ich kann mir den Grund zu diesen verschiedenen Resultaten nur durch besondere, individuell verschiedene Eigenschaften der einzelnen Blutseren erklären, welche die Ausfällung des Eiweißes mittels Liq. Ferri dialysat. hie und da ungünstig beeinflussen. Eine Garantie, daß auf diese Weise ein völlig eiweißfreies Filtrat stets erzielt wird, hat man jedenfalls nicht und dies ist bei der Reststickstoffbestimmung doch in erster Linie erforderlich. Für die Zuckerbestimmung im Blut mögen diese kleinen zurückbleibenden Eiweißmengen bedeutungslos sein, so daß diese Enteiweißungsart für die Bestimmung des Blutzuckers wohl angewandt werden mag. Für eine ausnahmslos sichere und genaue Bestimmung des Reststickstoffs mußte ich jedoch nach meinen Erfahrungen diese Methode als nicht geeignet erachten, weshalb ich auch von einer weiteren eingehenderen Untersuchung Abstand nahm, zumal ich durch einige

¹⁾ Der Harn, herausgeg. von Neuberg, Berlin 1911, 2. Bd., S. 1005

Vorproben feststellte, daß die anderen beiden Methoden bessere Resultate versprachen.

ad 2. Ich nahm 5 ccm Blutserum und tropfte dasselbe direkt von der Pipette in 25 ccm einer kochenden in einem Becherglas befindlichen 20%igen NaCl-Lösung, welche mit 5 Tropfen konzentrierter Essigsäure angesäuert war. Der sich bildende Niederschlag wird heiß filtriert und mit einer heißen mit Essigsäure angesäuerten 10%igen NaCl-Lösung (auf 500 ccm NaCl-Lösung 2,5 ccm konz. Essigsäure) 4 mal mit je 10 ccm nachgewaschen. Das Filtrat muß völlig wasserklar sein. Es wird dann mit 20 ccm Kjeldahl-Schwefelsäure (von Merck-Darmstadt) in einem Kjeldahl-Kolben versetzt, direkt über der Flamme eingedampft, bis zur Weißfärbung verbrannt und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt unter Vorlage von $\frac{1}{40}$ n-Schwefelsäure und Benutzung von Luteol als Indikator.

Es wurden bei allen Untersuchungen stets zwei Bestimmungen nebeneinander ausgeführt. Zur Untersuchung gelangte das Blut von Patienten, welche nierenkrank waren. Wie die untenstehenden Untersuchungsergebnisse zeigen, ergab sich bei den beiden Bestimmungen fast stets der gleiche Wert, kleine Verschiedenheiten waren innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen. Auch die zugesetzten Harnstoffmengen wurden richtig wiedergefunden. Die Methode kann daher als brauchbar gelten. Zu bemerken wäre nur, daß das unbedingt nötige klare Filtrat nach der Eiweißfällung mir bei manchen Seren nicht gelungen ist. In den meisten Fällen filtriert aber die Flüssigkeit, nachdem das anfänglich trübe Durchlaufende einigemal aufs Filter zurückgegossen wurde, schön klar. Nur solche Filtrate geben einwandfreie Resultate.

Untersuchungsergebnisse ad 2.

Patient	I.	1. Bestimmung	53,2 mg Rest-N in 100 ccm Serum
		2.	52,2 » » » 100 » »
»	II.	1.	86,5 » » » 100 » »
		2.	86,1 » » » 100 » »
»	III.	1.	54,9 » » » 100 » »
		2.	56,0 » » » 100 » »

Das Blut des Patienten III wurde auf 5 ccm mit 0,005 g chemisch reinem Harnstoff versetzt. Es wurden wiedergefunden:

		1.	Bestimmung	0,0046 g	Harnstoff		
		2.	»	0,005	»	»	
Patient IV.		1.	»	76,4 mg	Rest-N in 100 ccm Serum		
		2.	»	76,2	»	»	100
» V.		1.	»	59,0	»	»	100
		2.	»	58,2	»	»	100
» VI.		1.	»	80,6	»	»	100
		2.	»	81,4	»	»	100
» VII.		1.	»	50,6	»	»	100
		2.	»	50,8	»	»	100
» VIII.		1.	»	51,2	»	»	100
		2.	»	50,4	»	»	100

Dem Blute des Patienten VIII wurden auf 5 ccm 0,005 g chemisch reiner Harnstoff zugesetzt. Es wurden wiedergefunden.

1. Bestimmung 0,0048 g Harnstoff
2. » 0,0047 »

ad 3. Man erhitzt in einem etwa $\frac{1}{2}$ Liter fassenden Erlenmeyer-Kolben 150 ccm einer annähernd $\frac{1}{100}$ -n-Essigsäure (6 g Eisessig werden mit Wasser auf 100 ccm gebracht und davon 10 ccm mit Wasser auf 1 Liter verdünnt) zum Sieden. Nach Zusatz von 0,5 g Natriumacetat läßt man langsam 10 ccm, wenn vorhanden besser 20 ccm, der mit einer Pipette abgemessenen Blutserumprobe zutropfen, erhitzt mehrmals gerade bis zum Sieden und filtriert das kochend heiße Gemisch sofort durch ein Faltenfilter in eine Porzellanschale ab. Der Kolbenrückstand und die auf dem Filter befindliche koagulierte Masse wird 2 mal mit je 100 ccm heißem 0,5 g Natriumacetat enthaltendem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat muß vollkommen klar und farblos sein und enthält sämtlichen Reststickstoff des angewandten Serums. Es wird mit 3 ccm konzentrierter Essigsäure angesäuert, auf dem Wasserbade auf ca. 20 ccm eingedampft, durch ein kleines Filter direkt in einen Kjeldahl-Kolben filtriert und 2 mal mit je 20 ccm heißem, schwach essigsauerm Wasser ausgewaschen. Zu dem Kolben-

inhalt fügt man nach dem Erkalten 15 ccm Kjeldahl-Schwefelsäure (von Merck), erhitzt, bis das Wasser vollständig verdampft ist, was man daran erkennt, daß die Flüssigkeit sich dunkler färbt. Alsdann wird solange kräftig weiter erhitzt, bis der Kolbeninhalt farblos geworden ist, und der Stickstoff nach Kjeldahl unter Benutzung von $\frac{1}{40}$ -n-Schwefelsäure als Vorlage und Luteol als Indikator bestimmt.

Wie aus den folgenden Untersuchungen hervorgeht, welche sowohl nach der NaCl-Essigsäure als auch nach der Authenriethschen Methode stets in je zwei Bestimmungen ausgeführt wurden, um beide Verfahren miteinander zu vergleichen, sind die erhaltenen Resultate sämtlich als einwandfrei zu bezeichnen. Der Nachteil des Authenriethschen Verfahrens beruht lediglich in dem zeitraubenden Abdampfen. Andererseits hat dieses Verfahren den Vorteil, daß man größere Mengen Blut verwenden kann, was bei der NaCl-Essigsäurefällung eine zu große Anhäufung von Natriumchlorid bedingt, welches bei der Destillation durch unruhiges Kochen der spezifisch schweren Flüssigkeit stört. Da jedoch hier die mit 5 ccm Blut ausgeführten Bestimmungen vollkommen exakte Resultate ergaben, gebe ich der NaCl-Essigsäuremethode den Vorzug.

Untersuchungen nach 2 und 3.

A. Hammelblut.

NaCl-Methode.

1. Bestimmung 36 mg Rest-N in 100 ccm Serum
2. „ 38 „ „ „ 100 „ „

Methode nach Authenrieth.

1. Bestimmung 41 mg Rest-N in 100 ccm Serum
2. „ 39 „ „ „ 100 „ „

5 ccm des Hammelblutes wurden mit 0,05 g Harnstoff versetzt und nach der NaCl-Methode bestimmt. Es wurden wiedergefunden:

1. Bestimmung 0,0507 g Harnstoff
2. „ 0,0516 „ „

Desgleichen mit 0,005 g Harnstoff versetzt ergab folgendes Resultat:

1. Bestimmung 0,0049 g Harnstoff
2. » 0,0051 » »

20 ccm des Hammelblutes wurden mit 0,05 g Harnstoff versetzt und nach der Authenriethschen Methode bestimmt. Es wurden wiedergefunden:

1. Bestimmung 0,0505 g Harnstoff
2. » 0,05 » »

Desgleichen mit 0,005 g Harnstoff versetzt ergab folgendes Resultat:

1. Bestimmung 0,005 g Harnstoff
2. » 0,0052 » »

B. Ein anderes Hammelblut.

NaCl-Methode.

1. Bestimmung 26,6 mg Rest-N in 100 ccm Serum
2. » 26,4 » » 100 » »

Methode nach Authenrieth.

1. Bestimmung 26,8 mg Rest-N in 100 ccm Serum
2. » 26,4 » » 100 » »

5 ccm mit 0,005 g Harnstoff wie oben versetzt ergaben folgende Resultate:

Nach der NaCl-Methode.

1. Bestimmung 0,0047 g Harnstoff wiedergefunden
2. » 0,005 » » » »

20 ccm mit 0,005 g Harnstoff versetzt ergaben folgende Resultate:

Nach der Authenriethschen Methode.

1. Bestimmung 0,0051 g Harnstoff wiedergefunden
2. » 0,0052 » » » »

C. Menschenblut (Nierenerkrankung).

	NaCl- Methode	Authenriethsche Methode
In 100 ccm Serum: 1. Bestimmung	59 mg Rest-N	60 mg Rest-N
» 100 » » : 2. »	59 » »	61 » »

D. Menschenblut (Nierenerkrankung).

In 100 ccm Serum: 1. Bestimmung	58,8 mg Rest-N	59 mg Rest-N
» 100 » » : 2. »	58,8 » »	59,8 » »

E. Menschenblut (normal).

In 100 ccm. Serum: 1. Bestimmung	28,4 mg Rest-N	29,3 mg Rest-N
» 100 » » : 2. »	27,9 » »	29,1 » »

Auf Veranlassung von Herrn Direktor Prof. Dr. Müller habe ich nach Abschluß obiger Untersuchungen noch eine Methode der Eiweißfällung meinen Versuchen angeschlossen, welche in den von mir benutzten Büchern nicht verzeichnet war. Es ist dies die Entfernung des Eiweißes mittels Uranacetat.¹⁾ Da ein Vorversuch ein günstiges Resultat versprach, habe ich eine Reihe von Untersuchungen vorgenommen, welche diese Erwartungen bestätigten. Es stellte sich dabei sogar heraus, daß diese Methode wegen ihrer Einfachheit allen anderen Methoden vorzuziehen ist. Da nach den von mir angestellten Versuchen die NaCl-Methode sehr gute Resultate ergab, habe ich diese zur Prüfung der Uranmethode auf ihre Brauchbarkeit zum Vergleich benutzt und folgende Resultate erhalten. Das Blut war Menschenblut von verschiedenen Patienten.

	NaCl-Methode	Uran-Methode
I. In 100 ccm Serum:	23,8 mg Rest-N	22,4 mg Rest-N
II. » 100 » » :	58,8 » »	59,1 » »
III. » 100 » » :	37,1 » »	37,1 » »
IV. » 100 » » :	87,5 » »	88,9 » »
V. » 100 » » :	46,5 » »	46,2 » »
VI. » 100 » » :	34,3 » »	34,3 » »
VII. » 100 » » :	28,0 » »	28,0 » »
VIII. » 100 » » :	86,5 » »	86,1 » »

Diese Ergebnisse liefern den Beweis, daß beide Methoden gleich gut sind, denn die geringen Differenzen liegen innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen. Bei der Uranmethode geht jedoch die Ausfällung des Eiweißes viel schöner und da kein Erhitzen nötig ist, viel rascher vor sich; ich habe in allen Fällen gleich nach den ersten Tropfen ein tadellos wasserklares Filtrat erhalten. Die Vorschrift zur Uranmethode ist folgende: 10 ccm Blutserum werden in einem Mischzylinder von 50 ccm Inhalt mit 10 ccm einer 1,6%igen Uranacetatlösung versetzt, umgeschüttelt und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Man schüttelt gut durch, läßt 5 Minuten stehen und filtriert. 25 ccm des völlig klaren Filtrates, welche 5 ccm des angewandten Blut-

¹⁾ Die Methode ist in dem Taschenbuch der med.-klin. Diagnostik von Seifert-Müller auf Seite 95 angegeben.

serums entsprechen, werden mit 10 ccm Kjeldahl-Schwefelsäure in einem Kjeldahl-Kolben versetzt und der Stickstoff, wie bei den anderen Methoden angegeben, bestimmt. Wichtig ist auch hier ein völlig wasserklares Filtrat, was ich auch bei allen von mir untersuchten Blutseren erhalten habe. Nur ein Hammelblut, bei welchem Hämolyse eingetreten war, ergab ein schwach rötlich gefärbtes Filtrat, welches sich wegen seines Hämoglobingehaltes nicht zur weiteren Verarbeitung eignete. Ich habe aber auch in diesem Falle schließlich ein eiweißfreies Filtrat erhalten, indem ich die 25 ccm des Filtrates (= 5 ccm Blut) langsam bis zum Kochen in einem kleinen Bechergläschen erhitzte, heiß filtrierte, mit heißem Wasser gründlich auswusch und das nun wasserklare Filtrat wie oben angegeben weiter behandelte. Es ergab sich bei dieser Bestimmung ein Reststickstoffgehalt von 26,6 mg in 100 ccm Blut. Bei den untersuchten Menschenblutseren habe ich diese Korrektur niemals nötig gehabt. Ein hämolytisch gewordenes Blut wird praktisch kaum zu Reststickstoffbestimmungen in Betracht kommen, gegebenenfalls kann man jedoch auch hierbei, wenn man wie angegeben verfährt, ein eiweißfreies Filtrat erzielen.

Schlußfolgerung.

Zur Reststickstoffbestimmung im Blutserum eignet sich nur eine Enteiweißungsmethode, welche ein Filtrat ergibt, in welchem sich auch nicht die geringste Spur Eiweiß mehr vorfindet. Als solche Verfahren sind zu empfehlen:

1. die Ausfällung mit Natriumchlorid-Essigsäure in der Siedehitze,
2. die Ausfällung mit Natriumacetat-Essigsäure in der Siedehitze,
3. die Ausfällung mit Uranacetatlösung in der Kälte nach den angegebenen Vorschriften.

Aus praktischen Gründen ist der Uranacetatfällung der Vorzug zu geben.

Es ist stets darauf zu achten, daß ein völlig wasserklares Filtrat nach der Ausfällung des Eiweißes erhalten wird.