Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Eisens im Harne.

Von

Dr. Adolf Jolles in Wien.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. Max und Dr. Adolf Jolles in Wien.)

Die Angaben über die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens im Harne sind relativ sehr spärliche. Diese Thatsache dürfte nicht zum geringen Theile darauf zurückzuführen sein, dass das Eisen bekanntlich im Harne nicht direct, sondern erst nach dem Veraschen nachzuweisen ist, und da der Eisengehalt des Harnes im Allgemeinen ein minimaler ist, müssen relativ grosse Harnquantitäten verascht werden, welche Manipulation ausserordentlich viel Zeit beansprucht. Ueberdies erfordert die quantitative Bestimmung minimaler Eisenmengen nicht allein besondere Sorgfalt, sondern auch die Anwendung exacter Methoden, und die Differenzen in den Resultaten hinsichtlich des Eisengehaltes normaler Harne dürften auf die verschiedene Art der quantitativen Bestimmung zurückzuführen sein. Von älteren Autoren hatte Boussingault in der Asche des Tagesharnes 6 *mg*, Fleischmann 3 *mg* Eisen gefunden, während nach Magnier¹⁾ die Menge zwischen 3 und 11 *mg* variirt. Nach E. W. Hamburger²⁾ beträgt der Eisengehalt in der normalen Harnasche 1 *cg pro die*, welche Zahl von den meisten Autoren angenommen wird. In neuester Zeit hat Gottlieb³⁾ Analysen der Harnasche von 5 gesunden Versuchspersonen ausgeführt und als Mittelwerth für die Eisenausscheidung 2,59 *mg* Eisen gefunden. Dieser Durchschnitt ist wesentlich kleiner als

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. zu Berlin **7**, 1796.

2) Zeitschrift f. physiolog. Chemie **2**, 191: „Ueber die Aufnahme und Ausscheidung des Eisens.“

3) Archiv f. experim. Pathologie u. Pharmakologie **26**, 139—146; diese Zeitschrift **29**, 112.

der von Hamburger constatirte Mittelwerth von 1 *cg*, und wir müssen somit die Frage nach der Grösse der Ausscheidung des circulirenden Eisens im Harn gesunder Individuen noch heute als unentschieden bezeichnen. Diese Thatsache veranlasste mich an einem grösseren Untersuchungsmaterial den Eisengehalt quantitativ festzustellen und gleichzeitig die Methodik der Eisenbestimmung im Harn zu einer möglichst einfachen und exacten zu gestalten.

Bevor ich auf die Ergebnisse meiner diesbezüglichen Untersuchungen näher eingehe, möchte ich zunächst die bei der Veraschung der Harn gemachten Erfahrungen kurz besprechen, zumal über diese Manipulation in der Litteratur fast gar keine Angaben gemacht sind.

Zur Veraschung wurden von der sorgfältig gesammelten 24 stündigen Harnmenge 500 *cc* entnommen und in einer Porzellanschale am Wasserbade circa 4 Stunden eingedampft. Man vermag hierbei den Harn auf etwa $\frac{1}{15}$ bis $\frac{1}{10}$ seines ursprünglichen Volumens einzuengen, worauf das Wasserbad durch ein Luftbad von circa 180° C. ersetzt wird, wobei die Erhitzung der rückständigen Masse so lange erfolgt, bis sie gänzlich aufhört sich aufzublähen.

Ist der Zeitpunkt der Sinterung der verkohlenden Masse eingetreten und beginnt sie zu trocknen, dann befeuchtet man dieselbe mit absolutem Alkohol und bringt letzteren am Luftbade zur Entflammung.

Durch diesen Process wird die Veraschung wesentlich beschleunigt. Nunmehr wird der Rückstand direct über der Bunsenflamme, zuerst mit kleinerer, dann mit voller Flamme erhitzt, und zwar so lange, als noch Dämpfe aufsteigen. Hierauf wird die Schale erkalten gelassen, die schwarzgraue Masse mittelst eines Porzellanpistills in der Schale vorsichtig zu einer möglichst feinen Masse zerrieben, und das Pulver mittelst eines Pinsels in einen Glühtiegel von berliner Porzellan¹⁾ gebracht. Um die letzten Reste der Aschenkruste aus der Schale herauszubringen, wird das Erhitzen der Porzellanschale und das nachherige Pulverisiren mit dem Pistill noch ein- bis zweimal wiederholt. Das Hineinbringen der pulverisirten Aschentheile in den Tiegel soll möglichst schnell vor sich gehen, da die Aschenkrusten sehr hygroskopisch sind. Die letzten festgebrannten Reste der Aschenkruste werden mit

1) Von dem Gebrauche von Platingefässen zum Veraschen grösserer Harnmengen ist entschieden abzurathen, da die relativ grossen Mengen von Phosphaten etc. auf das Platin schädigend einwirken.

concentrirter Salpetersäure befeuchtet, dann mit heissem destillirtem Wasser gespült und mit Hülfe eines mit einem Stück Kautschuk-schlauch überzogenen Glasstabes mechanisch zerrieben und in den Tiegel gespült.

Dieser Vorgang hat sich als bequemer und weniger zeitraubend erwiesen wie die Behandlung des Rückstandes nur auf nassem Wege mit Säuren, indem die relativ grossen Quantitäten von Lösungen beim neuerlichen Eindampfen sehr viel Zeit beanspruchen. Die, wie oben angegeben, in den Tiegel gebrachte Aschenmasse, welche von den zum Ausspülen der Porzellanschale verwendeten geringen Säuremengen feucht erscheint, wird zuerst auf dem Wasserbade zur Trockne, dann im Luftbade und zuletzt über voller Bunsenflamme erhitzt, bis die Asche vollkommen trocken ist. Nunmehr bringt man den Tiegel in den Muffelofen und glüht den Tiegelinhalt mehrere Stunden hindurch, nach welcher Zeit die Asche völlig weiss gebrannt erscheint.¹⁾

Bezüglich der quantitativen Bestimmung des Eisens im Harn kommt bis jetzt meistens die Methode von Hamburger²⁾ — dessen Verfahren in den bekanntesten Anleitungen zur Harnanalyse empfohlen wird — in Betracht. Nach derselben wird die Harnasche behufs Auflösung des schwer löslichen Eisenoxys mit einem Gemisch von 8 Gewichtstheilen concentrirter Schwefelsäure und 3 Gewichtstheilen Wasser bis zum Sieden erhitzt. Die so erhaltene Lösung bringt man nun in einen entsprechend construirten Apparat, in welchem die Reduction des Eisenoxysalzes mittelst schwefliger Säure im Kohlensäurestrom ausgeführt wird.

Nach gänzlicher Verjagung der schwefligen Säure wird der Eisengehalt titrimetrisch mit Permanganat bestimmt. Nach Jacobi³⁾ ist die von Hamburger angewandte Reduction mit schwefliger Säure deshalb zu verwerfen, weil sich die schweflige Säure nicht vollständig durch Kohlensäure aus der Flüssigkeit entfernen lässt und schon sehr geringe Mengen zurückbleibender schwefliger Säure erhebliche Fehler bedingen. Auch die Reduction mit Zink und Schwefelsäure bedingt nach Jacobi Zahlen, die besonders durch den Eisengehalt auch des angeblich chemisch reinen Zinkes wesentlich beeinflusst sein können.

1) Nach 2 Bestimmungen ist der Tiegel in der Regel nicht mehr brauchbar und durch einen neuen zu ersetzen.

2) E. W. Hamburger, Zeitschrift f. physiolog. Chemie 2, 197.

3) Dissertation, Strassburg 1887.

Gottlieb¹⁾ bediente sich aus diesen Gründen nicht mehr der titrimetrischen, sondern der gewichtsanalytischen Bestimmung. Hierbei fand Gottlieb, dass das zu diesem Zwecke meist angewandte Verfahren, mit Ammoniak zu fällen und die mitgefällte Phosphorsäure durch öfteres Schmelzen mit kohlensaurem Natron zu entfernen, zu langwierig und bei so kleinen Eisenmengen grossen Fehlern unterworfen ist. Gottlieb empfiehlt daher als eine geeignete Methode, die Ausfällung des Eisens aus saurer Lösung als Berlinerblau. Der genaue Vorgang ist folgender: Die Harnasche wird mit Wasser ausgelaugt, um die löslichen Salze zu entfernen. Der Rückstand wird mit verdünnter Salzsäure aufgenommen, dazu einige Tropfen einer einprocentigen Zinkchloridlösung gegeben und hierauf mit Ferrocyankalium das Eisen mit dem Zink ausgefällt.

Der Ueberschuss des Ferrocyankaliums wird nun mit obiger Zinklösung ausgefällt und sodann der Niederschlag abfiltrirt. Nachdem man hierauf das vielleicht noch im Ueberschusse vorhandene Ferrocyankalium mit angesäuertem Wasser entfernt hat, schreitet man zur Zerlegung des Niederschlages mit 2procentiger heisser Kalilauge, löst den Niederschlag von Eisenoxyd in verdünnter Salzsäure und fällt mit Ammoniak als Eisenoxydhydrat. Um nun das mitgerissene Zink vom Eisen zu trennen, löst man den Niederschlag neuerdings in Salzsäure, fällt noch einmal und führt diese Operation noch ein drittesmal durch. Der Niederschlag wird dann getrocknet, gegläht und als Eisenoxyd gewogen. Nach Gottlieb soll obige Methode ziemlich leicht ausführbar sein und wenig Zeit beanspruchen. Nach unseren mit dieser Methode gemachten Erfahrungen kann von einer Einfachheit der Methode nicht die Rede sein; dieselbe erwies sich im Gegentheil als sehr complicirt und zeitraubend. Was die Genauigkeit der Gottlieb'schen Methode betrifft, so haben mehrere Controlanalysen die Zuverlässigkeit der Methode erwiesen. Wir sind jedoch fest überzeugt, dass diese Methode nur in der Hand eines geübten Analytikers brauchbare Resultate liefern wird, da bei ihr wiederholte Lösungen und Fällungen des Niederschlages unbedingt erforderlich sind, und so leicht Differenzen erhalten werden können, die, wenn auch noch so klein, hier in's Gewicht fallen müssen.

Aus den bisherigen Angaben resultirt jedenfalls die Thatsache, dass die Methodik der Eisenbestimmung im Harn sowohl hinsichtlich

¹⁾ Archiv f. experim. Pathologie u. Pharmakologie **26**, 139—146; diese Zeitschrift **29**, 112.

der Ausführung als der erforderlichen Zeit reformbedürftig ist, und haben meine in dieser Richtung angestellten eingehenden Versuche nachstehende erfolgreiche Ergebnisse geliefert:

A. Titrimetrische Eisenbestimmung.

Das titrimetrische Verfahren von Hamburger wird namentlich durch die vorgeschriebene Extraction des verkohlten Harnrückstandes mit Salzsäure und nachheriges Abrauchen mit Schwefelsäure zu einem langwierigen und umständlichen gestaltet.

Ich war daher im Verein mit meinem Assistenten, Herrn Kosmatsch, bemüht, das Verfahren sowohl hinsichtlich der Zeitinanspruchnahme als der Ausführung zu modificiren, und hat sich nachstehende Methode sehr gut bewährt:

Die weisse Harnasche wird mit siedendem Wasser so lange extrahirt, bis das wässrige Filtrat mit Silbernitrat keine Trübung mehr zeigt. Hierbei wird eine bedeutende Menge von Harnsalzen, darunter auch die bei der Titration mit Permanganat störend wirkenden Chloride, entfernt. Der Filtrerrückstand sammt Filter wird in eine Platinschale gebracht, das Filter verascht und hierauf der Rückstand mit wasserfreiem saurem schwefelsaurem Kali geschmolzen. Hierauf wird die Platinschale erkaltet gelassen, dann sammt Inhalt in ein entsprechendes Gefäss gegeben, mit heissem destillirtem Wasser die Masse herausgelaugt, die Platinschale aus dem Gefäss genommen und vorsichtig abgespült. Die gesammte Lösung wird nun in einen Kolben gebracht, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, etwas Zink hinzugesetzt, der Kolben mit einem Bunsen'schen Ventil verschlossen und auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem vollständigen Auflösen des Zinks wird mit Kaliumpermanganat titrirt und der Eisengehalt in bekannter Weise festgestellt. Die Angabe Jacobi's, dass die Reduction mit Zink und Schwefelsäure höhere Resultate liefert, ist in sofern richtig, als thatsächlich auch das sogenannte chemisch reinste Zink Spuren von Eisen enthält, die für technische Zwecke nicht in Betracht kommen. Bei der Bestimmung des Eisens im Harne jedoch, wo es sich um relativ minimale Eisenmengen handelt, spielen allerdings auch die Eisenspuren des Zinks eine Rolle. Dieser Fehler lässt sich aber sehr leicht eliminiren, wenn man zur Reduction der Lösung bekannte Mengen von Zink hinzufügt und den entsprechenden Eisengehalt des Zinks in Abzug bringt. In dem von uns verwendeten Zink wurden mehrere Bestimmungen des Eisengehaltes durch-

geführt, und resultirte — auf 1 g Zink berechnet — nachstehender Eisengehalt:

1. 0,00025 g
2. 0,00024 «
3. 0,00024 «
4. 0,00023 «
5. 0,00025 «

Man kann somit den Eisengehalt des Zinks als constant ansehen, und es ist nur bei der Reduction erforderlich, mit einer genau gewogenen Zinkmenge zu arbeiten, deren Eisengehalt bekannt ist. Wir haben zur Reduction des Eisens bei Verarbeitung von 500 cc Harn circa 2 g Zink verwendet und die entsprechenden Daten in Abzug gebracht. Die Resultate sind nach unseren Control-Analysen analytisch genau, und die nach dieser Methode erhaltenen Zahlen stimmen, wie Tabelle A zeigt, mit den nach der Methode Gottlieb resultirenden Daten gut und mit den nach Hamburger's Methode erhaltenen ziemlich gut überein.

B. Gewichtsanalytische Bestimmung.

Als ein für die quantitative Bestimmung des Eisens im Harn sehr geeignetes Reagens hat sich das von G. von Knorre¹⁾ empfohlene Nitroso- β -Naphтол erwiesen. Das Eisen wird aus salzsaurer Lösung durch eine concentrirte Nitroso- β -Naphтолlösung in 50 bis 52 procentiger Essigsäure als Ferrinitrosonaphтол ($C_{10}H_6O.NO$)₃Fe abgeschieden.

Der Niederschlag ist sehr voluminös, weshalb das Reagens speciell bei Harn, wo es sich um die Bestimmung minimaler Eisenmengen handelt, sehr gute Dienste leistet. Der in 50—52 procentiger Essigsäure unlösliche Niederschlag fällt rasch zu Boden und kann in relativ kurzer Zeit quantitativ bestimmt werden. Die Analyse des Niederschlages ergab, dass derselbe aus reinem Ferrinitrosonaphтол besteht; die bei der Fällung mit Ammoniak mitgefällte Phosphorsäure kommt also hier gar nicht in Betracht. Es entsprechen — da 1 Eisen 3 Molecüle Nitroso- β -Naphтол bindet

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. zu Berlin **20**, 283 und diese Zeitschrift **28**, 234.

516 Gewichtstheile Nitroso- β -Naphtol 56 Theilen Eisen, respective 80 Theilen Eisenoxyd.

Bereitung der Lösungen:

a) Nitroso- β -Naphtol.

1,2 g Nitroso- β -Naphtol. crystallisatum¹⁾ werden in 100 cc 50 procentiger Essigsäure unter Erwärmen auf circa 90° C. gelöst, die Lösung erfolgt rasch und ohne Rückstand. Von einem eventuell auftretenden minimalen Rückstande wird abfiltrirt und das Filtrat verwendet.

b) Essigsäure.

250 cc des reinen Eisessigs werden mit 150 cc destillirtem Wasser vermisch. Die erhaltene Solution hat eine Dichte von 1,0631, respective 9° Baumé.

Ausführung der Eisenbestimmung im Harn:

Die vollkommen weisse Harnasche wird mit Wasser extrahirt und das darin Unlösliche in wenig concentrirter Salzsäure unter Erwärmen gelöst. Das Eisen geht, wie wir uns überzeugten, vollkommen in Lösung. Die salzsaure Lösung wird — sobald die Bestimmung nicht in staubfreien Räumen vorgenommen wird — der Sicherheit wegen nochmals filtrirt und dann das Nitroso- β -Naphtol in der Kälte so lange zugesetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Bei Veraschung von 500 cc Harn, welche circa 2 bis 5 mg Eisen enthalten, sind nach unseren Versuchen 5 bis 10 cc Reagens erforderlich.

Nach erfolgter Fällung wird circa 5 Minuten mit einem Glasstab gerührt, dann circa 5 Minuten der Niederschlag absetzen lassen, hierauf auf ein mit 50 procentiger Essigsäure befeuchtetes Filter gebracht und mit dieser Essigsäure der Niederschlag ausgewaschen, bis die ablaufenden Tropfen schwach gelb gefärbt erscheinen.

In der Regel beträgt dann das Filtrat bei Verarbeitung des Aschenrückstandes von 500 cc Harn nicht mehr als 20—25 cc.

Die Methode ist, bei Einhaltung obiger Bedingungen, analytisch genau, wie dies nachstehende Control-Analysen zeigen.

¹⁾ Das nicht krystallisirte Nitroso- β -Naphtol, welches ein grünes Pulver darstellt, ist für obige Zwecke unbrauchbar, denn es hat einen Aschengehalt von 3,3 Procent, welcher im Wesentlichen aus Eisen und Kalk — von der Fabrikationsweise herrührend — besteht. Der Aschengehalt des krystallisirten Nitroso- β -Naphtols beträgt nur 0,1 Procent und kann bei der Analyse vernachlässigt werden.

Beleg-Analysen.

a) Mit Eisenlösungen von bekanntem Gehalt.

Von einer Eisenlösung, deren Eisengehalt genau bestimmt war, wurden verschiedene Mengen entnommen und der Eisengehalt mit Nitroso- β -Naphtol bestimmt.

Lau- fende Nummer	Eisen vorhanden	Eisen gefunden	Differenz.
1	0,0025 g	0,00245 g	0,00005 g
2	0,0025 „	0,0025 „	0
3	0,0050 „	0,00504 „	0,00004 „
4	0,0050 „	0,0053 „	0,00003 „
5	0,00125 „	0,00125 „	0
6	0,00125 „	0,0012 „	0,00005 „

b) Mit Harn.

Von den sorgfältig gesammelten 24 stündigen Harnmengen wurden stets zwei Eisenbestimmungen durchgeführt, und zwar nach verschiedenen Methoden. Wie aus der Tabelle A (Seite 157) ersichtlich ist, hat die Nitroso- β -Naphtol-Methode nahezu die gleichen Resultate geliefert wie die nach den Methoden von Hamburger, Gottlieb und durch Aufschliessung mit saurem schwefelsaurem Kali gewonnenen Daten. Als gewichtsanalytische Methode ist daher das Nitroso- β -Naphtol-Verfahren für Harn sehr geeignet und der Gottlieb'schen Methode vorzuziehen, da es nur eine Fällung erfordert und bedeutend rascher — etwa in $\frac{1}{3}$ der Zeit — durchführbar ist.

Ich war des Weiteren bemüht, meine im Jahre 1888 ausgearbeitete Methode zur colorimetrischen Bestimmung des Eisens im Wasser¹⁾ mit Hilfe von Rhodankalium auch für Harn entsprechend zu modifizieren.

Alle in dieser Richtung angestellten Versuche haben jedoch ergeben, dass eine exacte colorimetrische Bestimmung des Eisens im Harn nicht durchführbar ist, weil die Harnsalze die Eisenrhodanreaction störend beeinflussen. Die von Professor Bornträger (Chemiker-Zeitung 1896, S. 399) gemachte Annahme, dass die colorimetrische

1) Archiv für Hygiene 8, 402 (1888); diese Zeitschrift 30, 370.

Tabelle A.

Laufende Nummer	Name	Urin- menge in 24 Stun- den cc	Speci- fisches Gewicht	Eisengehalt im Liter nach den Methoden				Eisengehalt in 24 Stunden nach den Methoden				Eisen- gehalt in 24 Stun- den im Mittel g
				a. Auf- schliessung mit KHSO ₄ g	b. Ham- burger g	c. Gott- lieb g	d. Nitroso- β-Naphtol g	a. Auf- schliessung mit KHSO ₄ g	b. Ham- burger g	c. Gott- lieb g	d. Nitroso- β-Naphtol g	
1	J-s	1225	1,0265	0,00626	—	—	0,00641	0,00766	—	—	0,00785	0,00775
2	K-n	1340	1,0218	0,00680	0,00714	—	—	0,00911	0,00956	—	—	0,00933
3	M-r	1520	1,0192	0,00565	—	—	0,00549	0,00858	—	—	0,00834	0,00846
4	S	1460	1,0220	—	0,00610	—	0,00'30	—	0,00890	—	0,00773	0,00831
5	L-b	990	1,0286	—	0,00703	—	0,00610	—	0,00695	—	0,00603	0,00649
6	K-r	1050	1,0275	—	0,00937	0,00899	—	—	0,00983	0,00943	—	0,00963
7	G-v	1820	1,0225	0,00420	—	0,00397	—	0,00764	—	0,00722	—	0,00743
8	W-sch	1300	1,0210	—	—	0,00351	0,00364	—	—	0,00456	0,00473	0,00464
9	W-r	1410	1,0230	0,00620	—	0,00600	—	0,00874	—	0,00846	—	0,00860
10	L-N	1270	1,0245	—	—	0,00690	0,00670	—	—	0,00876	0,00850	0,00863
11	O	1275	1,0240	0,00710	—	—	0,00730	0,00905	—	—	0,00930	0,00917
12	L-d	2100	1,0160	—	0,00480	—	0,00400	0,01080	—	—	0,00840	0,00960

Bestimmung kleiner Eisenmengen mit Hilfe von Rhodankalium auch bei der Untersuchung von Harnen gute Dienste leisten wird, hat sich somit nicht bestätigt.

In Tabelle A (Seite 157) ist der Eisengehalt von 12 normalen Harnen, die durchweg von gesunden Individuen herrührten, angeführt. Zur Untersuchung gelangten stets die sorgfältig gesammelten 24stündigen Harnmengen und haben wir von jeder diesbezüglichen Harnportion zwei quantitative Eisenbestimmungen nach verschiedenen Methoden durchgeführt.

Aus den obigen analytischen Daten geht zunächst hervor, dass die nach der Methode von Hamburger erhaltenen Zahlen etwas höher ausfallen als die nach den übrigen gewonnenen Resultate. Die Differenzen sind jedoch bedeutend geringer, als wie sie von Jacobi, Gottlieb etc. angenommen werden. Des Weiteren resultirt aus der Tabelle A, dass die nach den Methoden: Gottlieb, Nitroso- β -Naphtol und Aufschliessung mit saurem schwefelsaurem Kali gewonnenen Resultate unter einander gut übereinstimmen. Zur quantitativen Bestimmung des Eisens im Harn können wir somit als titrimetrisches Verfahren die Aufschliessung mit saurem schwefelsaurem Kali etc., als gewichtsanalytische Methode die Nitroso- β -Naphtol-Methode wärmstens empfehlen. Bezüglich der Ausscheidungsverhältnisse des Eisens in normalen Harnen ergeben die in der Tabelle A angeführten Zahlen, dass der Eisengehalt *pro die* im normalen Harn zwischen 4,6 und 9,6 *mg* Eisen schwankt, somit im Mittel 7,1 *mg* Eisen beträgt. Wird jedoch aus den 12 Resultaten, welche den mittleren Eisengehalt der 24stündigen Harnmenge angeben, der Durchschnitt gezogen, dann resultirt die Zahl 8 *mg* Eisen *pro die*. Diese Zahl nähert sich der von Hamburger in der normalen Harnasche *pro die* gefundenen Zahl von 10 *mg* und ist erheblich höher, als die von Gottlieb in der Harnasche von gesunden Versuchspersonen im Mittel constatirte Zahl, 2,59 *mg* Eisen.