XVII.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zürich.

Eine Methode zur Bestimmung von Brom.

Von

F. Wünsche.

(Mit 1 Abbildung.)

Immer wieder taucht für den Pharmakologen gelegentlich die Forderung auf, ganz kleine Brommengen in tierischen Geweben, d. h. also neben NaCl, sicher quantitativ bestimmen zu können. Diese Forderung ist besonders aktuell geworden seit eine Reihe von bromhaltigen Schlafmitteln eingeführt wurde und somit die Aussicht bestand an Hand der Brombestimmung auch genauen Aufschluß über die Verteilung dieser Substanzen im Organismus zu erhalten. Dabei ist natürlich Voraussetzung, daß die betreffenden chemischen Verbindungen ihr Brom nicht schon bei Ausübung ihrer Wirkung abspalten und dieses dann eventuell andere Wege geht. In dieser Richtung sind wir, wenigstens was die Substanzen Neuronal, Bromural und Adalin anbetrifft, beruhigt, da die bisherigen Versuche das feste Haften des Broms gezeigt haben¹⁾.

Als Grundlage zur quantitativen Bestimmung diente die Arbeit von J. Guaresci²⁾ über den qualitativen Nachweis von Brom, welcher darauf beruht, daß eine 1‰ige, mittels schwefliger Säure oder Bisulfit + Salzsäure entfärbte Fuchsinlösung³⁾ sich mit geringen Mengen Brom violett färbt; die Anwesenheit von Jod, Chlor, Chromylchlorid, nitrosen Gasen und Aldehyden störe die Reaktion nicht, sie werde

1) Rosenmund, B. 42, 4480 (1909): Neuronal spaltet erst beim trocknen Erhitzen oder beim Kochen mit Wasser HBr ab.

2) C. 1912, II, 635, 867. Chemiker-Ztg. 1912, Rep. 613. Z. f. analyt. Ch. Bd. 52, S. 538 (1913).

3) In Mercks Reagenzienverzeichnis 1913, 138 und C. 1912, II, 635 wird irrtümlich 1‰ige Fuchsinlösung angegeben.

auch nicht durch diese Substanzen bedingt. — Zum Nachweis geringer Mengen Brom tränke man »stärkefreies« Filterpapier mit fuchsin-schwefliger Säure, hänge einen Streifen des Papiers über das Gefäß, in welchem die zu prüfende Substanz gelöst ist; füge der Lösung etwas Chlorwasser bei und erwärme schwach; Violettfärbung des Streifens zeige Brom an¹⁾. Aus der mit Chlorwasser versetzten Lösung kann man das Brom auch in Chloroform aufnehmen, die Chloroformlösung mit einigen Tropfen des Reagens schütteln und an der Violettfärbung die Anwesenheit von Brom erkennen. Feste Salze und organische Verbindungen werden zur Befreiung des Broms mit konzentrierter Chromsäurelösung behandelt, oder nach Messinger²⁾ mit Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure erhitzt. Beim Ausschütteln mit Äther sammelt sich der Farbstoff in der Grenzschicht.

Nach Abschluß der Versuche und längerer praktischer Anwendung unserer Methode im hiesigen Institut erschien eine Arbeit von W. Autenrieth³⁾ über Bestimmung von Brom in Organen nach Einnahme von Natriumbromid. Nach dieser Methode wird aus den Bromiden durch Oxydation mit Kaliumpermanganat und Schwefelsäure das Brom in Freiheit gesetzt, mit Chloroform ausgeschüttelt und im Keilkolorimeter kolorimetrisch bestimmt. Aus einem gravimetrischen Kontrollversuch ergab sich, daß statt 560 mg NaBr kolorimetrisch 500 (bzw. richtig 492 mg), also etwa 88 % gefunden wurden. (Bei der Berechnung, besonders bei der Umrechnung von Kalium- auf Natriumbromid sind in dieser Arbeit wohl einige Druckfehler unterlaufen.) Für unsere Zwecke würde sich die Methode nicht eignen, da mittels derselben nur verhältnismäßig größere Mengen Brom, mindestens 3—4 mg, zu bestimmen sind, während wir einer Methode bedurften, mit welcher Bruchteile von Milligrammen scharf bestimmt werden können.

Nach vielen anfangs ergebnislosen Vorversuchen gelang es, die qualitative Methode von Guaresci zu einer für physiologische Untersuchungen befriedigenden quantitativen auszubauen. Das Prinzip derselben besteht in folgendem: man oxydiert eine Lösung der zu prüfenden Substanz, nachdem das organisch gebundene Brom vorher in Bromid übergeführt wurde, mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung, treibt das freie Brom mittels Luft in ein Gefäß,

1) Bei einem Versuch im hiesigen Institut färbte sich das Reagenzpapier nach kurzer Zeit von selbst rot, war also unbrauchbar. Später zeigte sich bei eigenen Versuchen, daß das Reagens unter anderem auch durch Alkohol und Glycerin rot gefärbt wird.

2) B. 21, 2918 (1888).

3) Münchn. mediz. Wochenschr. Bd. 65, S. 33 (1918).

welches ein bestimmtes Volumen von fuchsinschweflicher Säure enthält, und bestimmt aus der Violettfärbung dieses Reagens den Bromgehalt kolorimetrisch.

Experimenteller Teil.

Vorversuche hatten ergeben, daß 1 mg Fuchsin etwa 1,4 mg Brom, bzw. daß 1 Molekül Fuchsin (Rosanilinchlorhydrat) etwa 6 Atome Brom bindet; auch hatte sich dabei gezeigt, daß es zweckmäßig ist, das freie Brom in einer diesem Verhältnis ungefähr entsprechenden Menge fuchsinschweflicher Säure aufzufangen, weil nur dann die optimale violette Färbung entsteht, welche eine genaue Bestimmung gestattet. Wird nämlich zu viel Fuchsinlösung vorgelegt, so färbt sich diese rötlich; wird aber zu wenig genommen, so flockt der violette Farbstoff sehr rasch aus.

Bei der kolorimetrischen Bestimmung muß selbstverständlich immer ein gleiches Volumen des Reagens zur Absorption des Broms vorgelegt werden; nur die Konzentration darf sich ändern. Um nun die Bedingung zu erfüllen, daß die Menge der fuchsinschweflichen Säure dem Bromgehalt der zu analysierenden Lösung ungefähr entspreche, konnte entweder das Reagens stets in gleicher Konzentration vorgelegt und die Menge der zu prüfenden Bromidlösung auf Grund eines oder zweier Vorversuche entsprechend gewählt werden, oder aber: man legt zur Absorption des Broms je nach Bedarf Lösungen verschiedener Konzentration vor, welche in der Volumeneinheit eine einem bestimmten Bromgehalt entsprechende Menge fuchsinschweflicher Säure enthalten; ich entschied mich für das letztere.

Herstellung der Reagenzien.

Es wurden zwei Vorratslösungen hergestellt:

I. 1 g Fuchsin wurde unter gelindem Erwärmen in 1 l destilliertem Wasser gelöst und filtriert.

II. Gasförmige SO_2 in destilliertem Wasser aufgefangen; der titrimetrisch bestimmte Gehalt an SO_2 betrug 2,3 g im Liter.

Durch Mischen entsprechender Mengen dieser beiden Lösungen und Verdünnen mit Wasser wurden die nötigen Reagenzien hergestellt, und zwar:

Nr. 1: 7,3 ccm Lösung I, 3,6 ccm Lösung II mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Nr. 2: 14,6 ccm Lösung I, 4,4 ccm Lösung II mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Nr. 3: 21,5 ccm Lösung I, 5,2 ccm Lösung II mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

In je 100 ccm der obigen drei Reagenzien sind also etwa 8 bis 12 mg SO_2 enthalten, wodurch sie monatelang haltbar und farblos bleiben; bei zu geringem SO_2 -Gehalt werden sie nach einigen Wochen rot.

Je 1 ccm der Reagenzien Nr. 1, 2, 3 dient zur Bestimmung von 0,1 bzw. 0,2 bzw. 0,3 mg Brom.

Apparatur (Maßstab etwa 1:2).

Bei den Versuchen wurden stets 2 ccm Reagens vorgelegt; durch Kombination dieser Reagenzien erhält man 2 ccm Reagens der gewünschten Konzentration für 0,2—0,6 mg Br, in Abstufung von je 0,1 mg. Es hat sich bei mehreren hundert von uns bisher ausgeführten Versuchen gezeigt, daß die besten Resultate mit mehr als 0,2 und weniger als 0,6 mg Br erhalten werden, wobei die Konzentration der zu analysierenden Lösung ohne wesentlichen Einfluß ist; man erhält

gleiche Resultate, ob z. B. 0,3 mg Br in 2 ccm oder in 10 ccm der zu untersuchenden Lösung verteilt sind. Das Reagens färbt sich dabei schön blauviolett; bei weniger als 0,2 mg Br wird es hell rötlichviolett, bei mehr als 0,6 mg Br jedoch zu dunkel, um eine genaue Schätzung zu erlauben. Innerhalb der angegebenen Grenzen von 0,2—0,6 mg Br sind bei einer Differenz von 0,1 mg Brom die Abstufungen in der Intensität der Farbe so groß, daß sich bei einiger Übung noch recht gut fünfzigstel Milligramm schätzen lassen.

Aus der umstehenden Zeichnung sind die einzelnen Teile des aus Glas gebauten Apparates leicht zu erkennen:

A ist das Oxydationsgefäß, dessen unterer zylindrischer Teil etwa 20 ccm faßt;

B ein in *A* eingeschliffener Deckel (eventuell ein gut passender Kautschukzapfen) mit drei eingeschmolzenen Röhren;

D das zur Aufnahme des Reagens dienende Absorptionsgefäß, dessen unterer engerer Teil etwa 2 ccm faßt; der obere Teil muß sehr geräumig sein (etwa 50—60 ccm), da die Flüssigkeit beim Einleiten der Bromdämpfe ziemlich stark schäumt;

E ein kleines Wasserbad;

A, *D* und *E* sind mittels Klammern an einem Stativ befestigt.

Herstellung der kolorimetrischen Vergleichslösungen.

Zur Eichung der Vergleichslösungen wird irgendein Bromid mit bekanntem Bromgehalt verwendet; ich bereitete aus chemisch reinem Kaliumbromid verschiedene Lösungen, welche pro 1 ccm je 1,0 mg NaCl und 0,1—0,5 mg Brom enthielten¹⁾.

An einem Beispiel soll nun gezeigt werden, wie die Vergleichslösungen geeicht werden; hieraus ergibt sich auch gleich zum größten Teil die Methodik der Untersuchung bzw. die Brombestimmung in Prüfungslösungen²⁾.

1,0 ccm der Bromidlösung mit 0,3 mg Br wird mit einer Pipette in das Gefäß *A* und je 1 ccm der Reagenzien Nr. 1 und 2 in das Gefäß *D* gebracht, hierauf aus dem Gasometer etwa 1½—2 l Luft durch den zusammengesetzten Apparat geleitet, d. h. bis das Reagens in *D* nicht mehr nach SO₂ riecht. Nun werden bei abgestellter Luftzuleitung in das Trichterchen *C* 2 Tropfen einer 3%igen Kaliumpermanganatlösung gefüllt, das Gefäß *A* bei geschlossenen

1) Diese Lösungen müssen, wie ja die später zu untersuchenden Organe, ebenfalls NaCl enthalten, dessen Gehalt von 1—6‰ betragen darf.

2) Rohr *d* und Gefäß *D* müssen vor jedem Versuche getrocknet werden, wozu jedoch kein Alkohol verwendet werden darf.

Hähnen einige Sekunden im Wasserbad gelinde erwärmt, das Wasserbad *E* entfernt und der Glashahn bei *C* geöffnet; infolge der Abkühlung kann die Permanganatlösung durch die Kapillare *c* nun einfließen, worauf 5 Tropfen 50%iger Schwefelsäure durch das Trichterchen nachgegossen werden. Bei geschlossenen Hähnen wird nun das Gefäß *A* 2—3 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, das Wasserbad wieder heruntergelassen und aus dem Gasometer ein langsamer Luftstrom durchgeleitet; nach kürzester Zeit beginnt die Flüssigkeit in *D* zu schäumen, und zwar um so heftiger, je mehr Brom vorhanden ist¹⁾; bei Abwesenheit von Brom ist keine Spur des Schäumens zu beobachten, die geringsten Mengen von Brom, d. h. weniger als 0,05 mg geben jedoch noch schwaches Aufschäumen und lassen sich hierdurch erkennen und eventuell abschätzen. Einige Sekunden nach Beginn des Schäumens färbt sich das Reagens erst rötlich, dann violett bis blau, und die Schaumblasen fallen zusammen. Zur Kontrolle, ob alles Brom in Freiheit gesetzt worden ist, werden nun bei abgestellter Luftleitung nochmals 1 Tropfen der Permanganatlösung und 5 Tropfen Schwefelsäure durch das Trichterchen eingeführt und ohne Erwärmen langsam Luft durchgeleitet; ein nochmaliges Aufschäumen zeigt weitere Bromentwicklung an; in den meisten Fällen, auch in unserem Beispiel bei 0,3 mg Br, genügen 2 Tropfen Permanganat. Es muß stets so viel Permanganat zugesetzt und so lange Luft durchgeleitet werden, bis das Schäumen in *D* aufhört; immerhin soll nicht mehr Luft durchgeleitet werden als nötig ist, um alles Brom überzutreiben. Das Aufhören des Schäumens ist ein sehr günstiges und unfehlbares Kriterium dafür, daß alles Brom übergetrieben und von dem Reagens gebunden ist.

Bei Beginn unserer Untersuchungen wurden zur Eichung jeder Vergleichslösung drei und mehr Vorversuche ausgeführt, bei einiger Übung genügten später 2—3 Versuche um ein richtiges Resultat zu erreichen.

Nach beendeter Reaktion wird die blaue Lösung aus dem Gefäß *D* in ein kleines Reagenzglas von etwa 6 mm Durchmesser und 3—4 ccm Inhalt gegossen und in einem zweiten gleichen Reagenzglas die haltbare, mit ihr übereinstimmende Vergleichslösung hergestellt, wozu man z. B. Gentianaviolett, Methylenblau und Fuchsin verwenden kann. Bei der enormen Färbekraft dieser Farbstoffe genügen Spuren derselben zur Herstellung der Vergleichslösungen.

1) Das Schäumen beginnt um so schneller, je weniger freie SO_2 in dem Reagens vorhanden ist; auch färbt sich das Reagens schneller violett, wenn vor Beginn der Oxydation genügend Luft durchgeleitet und die überschüssige SO_2 entfernt worden ist.

Es wurden davon Lösungen in 10%igem wässerigen Glyzerin bereitet; zuerst die Gentianaviolettlösung mit 10%igem Glyzerin so weit verdünnt, bis die Intensität der Farbe ungefähr mit derjenigen des Bromfuchsin übereinstimmte, dann mit Methylenblau oder (was jedoch selten nötig war) mit sehr verdünnter Fuchsinlösung der Farbton mit dem in unserem Reagens erhaltenen gleichgestimmt und die Vergleichsgläser zugeschmolzen. Mit 10% Glyzerin halten sich diese Lösungen, wie Kontrollversuche ergaben, nun schon über 1 Jahr; nur die Lösungen für 0,2 und 0,3 mg Br mußten nach $\frac{1}{2}$ Jahr neu hergestellt werden, da sie merklich abgeblaßt waren.

Die Vergleichsgläser werden am besten in einem kompakten Holzgestell aufbewahrt, welches vertikale Bohrungen und für jede Bohrung vertikale Schlitze in der vorderen und hinteren Wand des Holzklotzes haben, um die Lösungen in der Durchsicht vergleichen zu können (analog dem Sahlischen Hämoglobinometer). Zwischen je zwei Vergleichsgläsern für verschiedenen Bromgehalt wird immer eine Bohrung frei gelassen, in welche das bei der Ausführung der Analyse gewonnene blaue Reagens kommt. Durch Verstellen dieses letzteren zwischen die verschiedenen Vergleichslösungen kann die kolorimetrische Bestimmung rasch ausgeführt werden. Eine Scheibe aus Mattglas an der hinteren Wand des Gestelles hält störende Lichtstrahlen ab und erleichtert das scharfe Vergleichen der Lösungen.

Prüfung einer Substanz auf Brom.

Zur Vorprüfung wird in das Gefäß *A* ein bestimmtes Volumen der neutralen Bromidlösung, die also noch andere Salze daneben enthalten kann, sowie 2 ccm eines Reagens mittlerer Konzentration in das Gefäß *D* gebracht und dann weiter verfahren, wie oben bei der Herstellung der Vergleichslösungen beschrieben; zuerst wird durch $1\frac{1}{2}$ —2 l Luft die überschüssige SO_2 größtenteils vertrieben, dann 2 Tropfen Permanganat und 5 Tropfen Schwefelsäure zur Prüfungssubstanz gefügt und diese im siedenden Wasserbad 1—2 Minuten erwärmt, das freie Brom durch einen mäßigen Luftstrom übergetrieben. Ein Aufschäumen zeigt Brom an, bei einiger Übung kann schon aus dem Verlauf des Schäumens die Menge des Broms ungefähr geschätzt werden. Wenn das Schäumen stark war und das Reagens tief blauviolett gefärbt, so wird nochmals die angegebene Menge des Oxydationsgemisches durch das Trichterchen *C* eingeführt und ohne zu erwärmen Luft durchgeleitet, bis ein eventuell nochmaliges Schäumen beendet ist; war jedoch bei der ersten Oxydation das Schäumen nur schwach und wird das Reagens schließlich nur rötlichviolett gefärbt,

so ist dies ein Zeichen, daß in der Prüfungslösung nur wenig Brom und das zum Versuch verwendete Reagens zu stark war; für den zweiten Versuch muß also ein schwächeres Reagens genommen werden. Wird umgekehrt das Reagens beim Vorversuch dunkel blauviolett oder flockt der Farbstoff gar aus, so war mehr Brom vorhanden als dem angewendeten Reagens entsprach; beim nächsten Versuch muß daher ein stärkeres Reagens oder weniger Prüfungslösung angewendet werden. Schon beim ersten Vorversuch läßt sich aus dem Verlaufe des Schäumens, der Intensität und dem Ton der Färbung, unter Umständen dem Ausflocken des Farbstoffes ziemlich genau schätzen, wieviel Brom vorhanden war, so daß zum zweiten Versuch fast stets die richtigen Verhältnisse gewählt werden können, d. h. die der Brommenge entsprechende richtige Fuchsinlösung; in allen Fällen genügten uns hierzu stets zwei Vorversuche und gab der dritte Versuch immer das richtige Resultat. Es ist nicht nötig das Reagens der Brommenge peinlich genau anzupassen, und kann man z. B. mit 2 ccm Reagens Nr. 2, welches also ungefähr 0,4 mg Br entspricht, sowohl 0,3 mg als auch 0,5 mg Brom noch bestimmen; immerhin ist es besser und auch nach ganz kurzer Übung sehr einfach das Reagens richtiger Konzentration zu nehmen: ein sicheres Zeichen hierfür ist die schön blauviolette Farbe, welche etwa $\frac{1}{2}$ Stunde ohne auszuflocken anhält.

Die Methode ließe sich für Lösungen mit mehr Bromgehalt leicht anpassen. Damit die Reagenzien in diesem Falle nicht zu dunkel werden, müßte man sie stärker verdünnen und dementsprechend ein größeres Volumen dieser verdünnten Reagenzien zur Absorption des Broms anwenden; selbstverständlich müßte dafür eine andere Reihe von Vergleichslösungen hergestellt werden. Beispielsweise könnte man 5 ccm des Reagens Nr. 2 zur Bestimmung von 1,0 mg Brom nehmen. Nach Ausführung der Oxydation würde die Farbintensität dieses Reagens ungefähr mit derjenigen unserer Vergleichslösung für 0,4 mg Brom übereinstimmen.

Für die Untersuchungen im hiesigen Institut, bei welchen es sich meist nur um sehr wenig Brom handelte, war die angegebene Konzentration der Fuchsinlösung am geeignetsten.

Prüfung der Methode an tierischen Organen.

Um die Brauchbarkeit und Genauigkeit der Methode an bromhaltigen tierischen Organen zu prüfen, wurde Rinderblut mit bekannten Mengen Neuronal versetzt, sowie Fröschen bestimmte Mengen von Neuronal, Adalin bzw. Bromural injiziert. Die tierische

Substanz wird in Nickelschalen mit Natriumsuperoxyd versetzt, anfangs auf dem Wasserbade, dann auf freier Flamme getrocknet und schließlich verascht; die Asche wird wiederholt mit heißem destillierten Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion ausgelaugt, das Filtrat in kleinen Kölbchen vorsichtig mit starker Schwefelsäure fast neutralisiert, mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und aliquote Teile derselben in oben beschriebener Weise auf Brom geprüft.

Es sei noch bemerkt, daß bei Anwesenheit von viel Chlorid bzw. von sehr wenig Brom die Permanganatlösung verdünnt werden muß und nur 1 Tropfen einer etwa 2%igen Lösung zu nehmen ist, auch muß in diesem Falle nach der Oxydation die Luft besonders vorsichtig durchgeleitet werden. Immerhin zeigten Kontrollversuche mit verschiedenen Beigaben von NaCl, daß die Mengen, welche in etwa 50 g tierischer Substanz vorkommen, die Reaktion nicht stören.

Orientierende Vorversuche, ausgeführt mit Neuronal, welches in Rinderblut gelöst war, ergaben, daß das Maximum an Brom wiedergefunden wird, wenn bei dem Eindunsten der organischen Substanz verhältnismäßig viel Na_2O_2 genommen wird und die Veraschung energisch erfolgt. Wir nahmen in der Folge für etwa 30 g tierischer Substanz stets ungefähr 4–5 g Na_2O_2 , welches in drei Portionen (bei Beginn des Eindampfens und je nach $1\frac{1}{2}$ –2 Stunden) zugefügt wurde. Die Verbrennung und Veraschung der Substanz wird vom Rande der Schale her begonnen und allmählich bis zur rauschenden Flamme eines guten Bunsenbrenners gesteigert.

Auf alle Fälle muß die Verbrennung der organischen Substanz so weit gehen, daß das Filtrat der Asche farblos und nicht mehr gelblich ist; sollte letzteres einmal vorkommen, so muß das Filtrat vor der Neutralisation nochmals eingedunstet, getrocknet und verbrannt werden.

Eine zweite Versuchsreihe zeigt, welcher Anteil des beigegefügt bromhaltigen Narkotikums wiedergefunden wird, d. h. ob und innerhalb welcher Grenzen die Methode als quantitativ bezeichnet werden kann.

Je 30 ccm Blut wurden mit verschiedenen Mengen Neuronal versetzt, weiter wie beschrieben behandelt und dabei gefunden:

Versuch Nr.	Zugesetzt Neuronal mg	Gefunden		
		Brom mg	Neuronal mg	%
1	2,0	0,73	1,76	88,0
2	10,0	3,60	8,75	87,5
6	20,0	7,03	17,07	85,3

Es wurden also 85—88% des zugefügten Narkotikums wiedergefunden, was für physiologische Probleme eine genügende Genauigkeit ist. Übrigens wurden diese orientierenden Versuche vor $1\frac{1}{2}$ Jahren ausgeführt; nach erlangter Übung wurde 94% und mehr wiedergefunden, besonders, wenn es sich um kleine Mengen Brom handelte.

Zum Schluß sollen noch einige Kontrollversuche beigelegt werden, welche mit Neuronal, Adalin und Bromural an Fröschen angestellt wurden.

Frosch Nr. 29.

0,080 g Neuronal, gelöst in 2 ccm Alkohol¹⁾, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 10,0 ccm; davon injiziert 1,0 ccm = 0,008 g Neuronal. Frosch getötet, in Nickelschale zerkleinert, mit etwas destilliertem Wasser und etwa $1\frac{1}{2}$ g Na_2O_2 versetzt, auf dem Wasserbad erwärmt; in Zwischenräumen von etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden noch 2 mal je etwa $1\frac{1}{2}$ g Na_2O_2 zugefügt, auf freier Flamme getrocknet und verbrannt; die Kohle mit Porzellanpistill zerrieben und stark erhitzt, bis die Asche hellgrau war. Hierauf mit heißem destilliertem Wasser aufgenommen, in ein kleines Kölbchen filtriert, Schale und Pistill wiederholt gewaschen, bis eine mit HNO_3 angesäuerte Probe des Filtrates mit AgNO_3 keine Trübung mehr gab. Die stark alkalische Lösung vorsichtig mit Schwefelsäure versetzt, bis zur schwach lackmusalkalischen Reaktion, und mit destilliertem Wasser auf 50,0 ccm aufgefüllt.

Hiervon wurden für den ersten Vorversuch 5,0 ccm genommen, je 1 ccm Reagens Nr. 2 und 3 vorgelegt und 2 mal mit je 1 Tropfen 6% KMnO_4 und 5 Tropfen 50% H_2SO_4 oxydiert; kolorimetrisch gefunden 0,34 mg Brom. Zweiter Vorversuch, gleich wie erster angestellt, ergab 0,32 mg Br. Dritter Versuch: 5,0 ccm Lösung, 2 ccm Reagens Nr. 2, Oxydation 2 mal, ergab 0,3 mg Brom. Vierter Versuch: wie Nr. 3, ergab 0,32 mg Br. Im Mittel wurde also bei diesen vier Versuchen 0,32 mg Brom pro 5 ccm Lösung, daher 3,20 mg in der Gesamtlösung gefunden. Als Neuronal berechnet $3,20 \times 2,428 = 7,77$ mg

oder 97,2% Neuronal wiedergefunden.

Frosch Nr. 30.

0,100 g Adalin, gelöst in 6 ccm Alkohol, mit destilliertem Wasser auf 10,0 ccm aufgefüllt; davon injiziert 1,0 ccm = 0,010 g Adalin, weiter wie im vorigen Versuch verfahren, Filtrat der Asche auf 50,0 ccm gebracht. In je 5,0 ccm wurden gefunden: 0,33, 0,30, 0,30, 0,32 mg Br, im Mittel 0,314 mg Brom pro 5 ccm; insgesamt 3,14 mg Br = $3,14 \times 2,967 = 9,31$ mg

oder 93,1% Adalin wiedergefunden.

1) Die in Wasser schwer löslichen Narkotika wurden bei den Kontrollversuchen in verhältnismäßig viel Alkohol gelöst, da es sich ja hier nur um die Brombestimmung handelte und der Einfluß des Alkohols auf die Narkose nicht zu berücksichtigen war.

Frosch Nr. 31.

0,100 g Bromural, gelöst in 4 ccm Alkohol, mit destilliertem Wasser auf 10,0 ccm gebracht, davon 1,0 ccm = 0,010 g injiziert und gefunden: im Mittel von vier Versuchen $3,33 \text{ mg Br} = 3,33 \times 2,792 = 9,30 \text{ mg}$ oder **93,0 %** Bromural wiedergefunden.

Diese Versuche ergaben demnach die Brauchbarkeit der Methode. Mit der Einführung derselben ist einem lange bestehenden Bedürfnis entsprochen worden, indem nun aus etwa 50 g tierischer Organe mit genügender Genauigkeit noch 0,2 mg Brom (bzw. etwa 0,5 mg eines bromhaltigen Narkotikums) quantitativ bestimmt werden können; noch kleinere Beträge haben auch kein pharmakologisches Interesse mehr.