Vereinfachung des Verfahrens zur Bestimmung von Salpetersäure in der Milch mit Diphenylamin-Schwefelsäure.

Von

Dr. J. Tillmans und Dr. A. Splittgerber.

Mitteilung aus der Chemisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Dr. J. Tillmans) des Städtischen Hygienischen Instituts in Frankfurt a. M. (Direktor: Professor Dr. M. Neißer.)

[Eingegangen am 2. Juli 1911.]

Im Anschluß an das im vorigen Jahre veröffentlichte neue Verfahren zum Nachweise und zur Bestimmung von Salpetersäure in der Milch¹⁾ bringen wir mit dieser Arbeit eine bedeutende Vereinfachung in der Serumbereitung und in der Herstellung der Vergleichslösungen. Die im vorigen Jahre bekannt gegebene, im weiteren Verlauf dieser Arbeit kurz mit „altes Verfahren“ bezeichnete Methode hat sich zwar recht gut bewährt und uns bei der Milchuntersuchung vorzügliche Dienste geleistet, doch lag uns vor allen Dingen daran, die Methode so auszugestalten, daß sie ohne größeren Zeitverlust auch für Massenuntersuchungen Anwendung finden kann.

Neues Verfahren der Serumbereitung.

Nach mancherlei Versuchen fanden wir, daß die von Tillmans und Suthoff²⁾ bei der Bestimmung der präformierten Schwefelsäure in der Milch angewendete Art der Serumbereitung mittels einer Mischung von Salzsäure und Quecksilberchlorid auch für diesen Zweck die beste war. Hierdurch erzielt man im Augenblick ein vollkommen klar filtrierendes, protein- und fettfreies Serum. Das Filtrieren durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll No. 577) geht so schnell, daß die löslichen Stoffe, die etwa mit Diphenylamin-Schwefelsäure unter Blaufärbung reagieren, in keiner Weise sich störend bemerkbar machen, wie wir durch eine Anzahl von übereinstimmenden blinden Versuchen gefunden haben.

Die Serumbereitung gestaltet sich daher folgendermaßen:

25 ccm Milch werden in einem verschließbaren Schüttelzylinder von 50 ccm Inhalt mit 25 ccm einer Mischung aus gleichen Teilen einer 5%-igen Quecksilberchloridlösung (Hydrarg. bichlorat. puriss. p. a.) und einer 2%-igen Salzsäure (8 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,125 und 92 ccm Wasser)³⁾ versetzt und kurz umgeschüttelt. Darauf wird durch ein Faltenfilter filtriert und das wasserklar ablaufende Filtrat sofort der Reaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure unterworfen, indem man 1 ccm des Filtrats mit 4 ccm des von Tillmans vorgeschriebenen Reagens im Röhrchen versetzt, umschüttelt und nach 1 Stunde die entstandene Färbung beobachtet.

Das Diphenylamin-Reagens wird folgendermaßen bereitet: 0,085 g Diphenylamin werden in einen 500 ccm Meßkolben gebracht und 190 ccm verdünnte Schwefelsäure (1 + 3) daraufgegossen; darauf wird konzentrierte Schwefelsäure (spez. Gewicht 1,84)

¹⁾ Diese Zeitschrift 1910, 20, 676—707.

²⁾ Diese Zeitschrift 1910, 20, 49—63 (54).

³⁾ Die Mischung läßt sich beliebig lange aufbewahren.

zugegeben und umgeschüttelt. Dabei erwärmt sich die Flüssigkeit so sehr, daß das Diphenylamin schmilzt und sich löst. Man füllt jetzt mit konzentrierter Schwefelsäure fast bis zur Marke auf und läßt abkühlen. Dann füllt man ganz bis zur Marke mit konzentrierter Schwefelsäure auf und mischt. Das gut durchgemischte Reagens wird in einer geschlossenen Flasche aufbewahrt und hält sich unbegrenzt. Die angegebenen Mengenverhältnisse sind genau innezuhalten. Es ist salpetersäurefreie Schwefelsäure zu verwenden. Ist die Schwefelsäure salpetersäurehaltig, so wird das Reagens nach dem Auffüllen mit Schwefelsäure blau; bei Verwendung salpetersäurefreier Schwefelsäure bleibt es aber ganz farblos¹⁾.

Natürlich müssen die zur Verwendung kommenden Gefäße (Erlenmeyer-Kolben, Reagentgläser u. s. w.) vor dem Gebrauch mit vollständig salpetersäurefreiem Wasser ausgespült werden. Das gewöhnliche destillierte Wasser enthält zuweilen noch Spuren von Salpetersäure, von denen es durch nochmaliges Destillieren unter Zusatz einiger Tropfen Natronlauge vollständig befreit wird.

Man prüft das destillierte Wasser und die Reagenzien am einfachsten und sichersten durch einen blinden Versuch mit denselben Reagenzien und Materialien, bei dem statt Milch destilliertes Wasser angewendet wird.

Durch die vorhergehende Behandlung ist die Milch auf das doppelte Volumen verdünnt worden, sodaß die etwa entstehende Färbung nicht den wahren Gehalt, sondern nur die Hälfte der vorhandenen Menge an Salpetersäure angibt. Diese Verdünnung darf man aber bei der sehr großen Empfindlichkeit des Reagens²⁾ unbedenklich anwenden.

Herstellung der Vergleichslösungen.

Ebenso wie bei dem „alten Verfahren“ werden auch bei der eben erwähnten Art der Serumbereitung nicht alle Körper entfernt, die auf die Reaktion hemmend einwirken, eine Erscheinung, die deutlich bemerkbar wurde, als wir mit wässerigen Vergleichslösungen zu arbeiten versuchten. Wir erhielten hierbei konstant zu niedrige Zahlen. Ohne uns auf weitere Untersuchungen einzulassen, aus welchen Bestandteilen sich diese störenden Körper zusammensetzen konnten, stellten wir uns jetzt wässrige Vergleichslösungen mit entsprechend geringeren Gehalten an Salpetersäure her.

Je viermal wurde nitratreie Milch mit soviel Kaliumnitrat versetzt, daß der N_2O_5 -Gehalt 1, 2, 3, 4, 5 mg im Liter betrug, was nach der Fällung einem Gehalt von 0,5—2,5 mg im Liter entspricht. Mit diesen Lösungen wurden die Reaktionen angestellt, wobei die Färbungen bei denselben Gehalten untereinander jedesmal genau übereinstimmten. Zu gleicher Zeit war die Reaktion mit wässerigen Vergleichslösungen angestellt worden, deren Gehalte von 0,3 mg im Liter anfangend um je 0,1 mg stiegen. Es ergab sich, dass den Gehalten von 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mg im Liter in der Verdünnung oder 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 mg im Liter in der Milch wässrige Vergleichslösungen von 0,45, 0,85, 1,2 1,5 2,0 mg im Liter entsprechen.

Die Abschwächung der Blaufärbung gegenüber wässerigen Vergleichslösungen beträgt also 10⁰/₀, 15⁰/₀, 20⁰/₀, 25⁰/₀, 26⁰/₀.

¹⁾ Salpetersäurefreie, nach den Kontaktverfahren hergestellte Schwefelsäure (SO_3 in destilliertes Wasser eingeleitet) kann von der hiesigen Firma Dr. Bachfeld & Co., Kaiserstraße 33, zum Preise von 0,60 Mk. pro kg bezogen werden.

²⁾ Die Empfindlichkeit geht bei Wasser bis 0,1 mg N_2O_5 im Liter und bei Milchserum (nach dem „alten Verfahren“ hergestellt) bis 0,25 mg N_2O_5 im Liter.

Die Herstellung der Vergleichslösungen gestaltet sich darnach folgendermaßen:

Man geht aus von einer Lösung, die 100 mg N_2O_5 im Liter enthält, wie sie bei der Salpetersäurebestimmung im Wasser nach Noll zur Anwendung kommt (0,1871 g Kaliumnitrat im Liter). Von dieser Lösung gibt man in Meßkölbchen von 100 ccm Inhalt je: 0,45, 0,85, 1,2, 1,5 und 2,0 ccm, setzt 2 ccm kaltgesättigte Kochsalzlösung (weil die Reaktion nur bei Anwesenheit von Chloriden gut eintritt)¹⁾ und 10 ccm Eisessig hinzu und füllt auf 100 auf. Die so hergestellten Vergleichslösungen, die sich unbegrenzt halten, entsprechen einem Gehalte von 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 mg N_2O_5 im Liter in der Milch.

Prüfung des Verfahrens.

Um das Verfahren auf seine Genauigkeit zu prüfen, wurden gewässerte Milchproben mit verschiedenen Wässern hergestellt. Der Wasserzusatz war dem Analytiker unbekannt.

Die Quecksilberchlorid-Salzsäure-Sera wurden bereitet und bei diesen zugleich mit den obigen Vergleichslösungen die Reaktion in folgender Art angestellt: Man gibt je 1 ccm der Vergleichslösungen und der Sera in Reagensröhrchen, läßt 4 ccm Diphenylamin-Schwefelsäure an der Wand des Röhrchens herunterfließen, mischt und kühlt ab. Die Röhrchen bleiben unter öfterem Durchschütteln eine Stunde stehen. Die bei den zu untersuchenden Serumproben entstandenen Färbungen werden dann mit denen der Vergleichslösungen verglichen.

In den Wasserproben wurde der Salpetersäuregehalt nach Noll bestimmt. Die prozentuale Wässerung wurde nach der Formel $x = \frac{100 \cdot a}{b}$ berechnet, worin a den in der Milch gefundenen Gehalt an Salpetersäure, b den Salpetersäuregehalt des betreffenden Wassers angibt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in der Tabelle auf S. 404 zusammengestellt.

Die Übereinstimmung der gefundenen Zahlen mit dem vorgenommenen Wasserzusatz ist danach eine ausgezeichnete.

Zu beachten ist bei der Ausführung der quantitativen Bestimmung noch, daß durch längeres Stehenlassen des Quecksilberchlorid-Salzsäure-Serums die Salpetersäure zersetzt wird, sodaß man z. B. nach einigen Stunden schon niedrige Ergebnisse erhält. Es empfiehlt sich deshalb besonders bei Massenuntersuchungen, zunächst alle Vorbereitungen zu treffen, (Kolben zurechtstellen, ausspülen, Trichter aufsetzen, Milch einfüllen u. s. w.) und nach dem Versetzen mit der Quecksilberchlorid-Salzsäurelösung sofort zu filtrieren und die Reaktion anzustellen. Bei einer derartigen Art des Arbeitens erhält man stets durchaus zuverlässige Ergebnisse, wie die Zahlen der Tabelle deutlich zeigen.

Bei höheren Gehalten an Salpetersäure muß man verdünnen, da sonst die Färbungen so stark werden, daß die Töne nicht mehr zu unterscheiden sind. Das geschieht in diesem Falle am besten so, daß man anstatt der 25 ccm nur 12,5 oder 10 ccm u. s. w. Milch anwendet und die an den 25 ccm fehlende Menge mit destilliertem Wasser ergänzt. Man kann aber auch so vorgehen, daß man das Serum wie

¹⁾ Vergl. diese Zeitschrift 1910, 20, 685.

gewöhnlich bereitet und es einfach mit destilliertem Wasser soweit wie notwendig verdünnt. Bei dieser Art des Arbeitens sind bei einer 5-fachen Verdünnung noch die notwendigen Mengen von Chlor vorhanden.

Obgleich das Arbeiten mit den von uns empfohlenen wässrigen Vergleichslösungen schon sehr einfach ist, würde sich doch noch eine weitere Vereinfachung durch Konstruktion eines Colorimeters erzielen lassen. Organische Farbstoffe für diesen Zweck anzuwenden, ist nicht empfehlenswert, da sie sich am Licht verändern. Wir haben deshalb gefärbte Gläser in Auftrag gegeben. Die Herstellung dieser Gläser in der richtigen Farbennuance scheint aber nicht ganz einfach zu sein. Wir können daher zurzeit noch nicht entscheiden, ob das Colorimeter zustande kommt.

Salpetersäurebestimmung in gewässerten Milchproben.

No.	Gehalt des Wassers an N_2O_5 mg im Liter	mg N_2O_5 im Liter Milch		Wasserzusatz (‰)	
		vorhanden	gefunden	gemacht	gefunden
1	10	2,0	2,0	20	20
2	10	1,6	1,5	16	15
3	10	0,45	0,5	4,5	5
4	10	0,85	0,75	8,5	7,5
5	25	1,75	1,75	7	7
6	25	2,25	2,0	9	8
7	25	2,75	3,0	11	12
8	25	6,25	6,0	25	24
9	—	0	0	0	0
10	30	1,2	1,25	4	4,2
11	30	0,9	1,0	3	3,3
12	30	3,6	3,5	12	11,7
13	38,8	3,88	4,0	10	10,3
14	38,8	5,43	5,5	14	14,1
15	38,8	5,04	5,0	13	12,8
16	38,8	0,78	0,75	2	1,9
17	48,3	1,93	1,5	4	3,1
18	48,3	10,63	10,0	22	20,7
19	48,3	8,69	8,0	18	16,6
20	48,3	3,86	3,5	8	7,0

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Herstellung eines wasserklaren, sehr gut filtrierenden protein- und fettfreien Milchserums erfolgt in der Weise, daß man je ein Volumen Milch und Quecksilberchlorid-Salzsäure bestimmter Konzentration zusammengießt, durchschüttelt und durch Faltenfilter vom Koagulum abfiltriert.

1 ccm dieses Serums wird mit 4 ccm Diphenylaminreagens (Tillmans) vermischt. Nach dem Abkühlen läßt man unter öfterem Umschütteln eine Stunde stehen. Ist Salpetersäure vorhanden, so ist das Gemisch nach dieser Zeit mehr oder weniger stark blau gefärbt.

2. Das wie oben angegeben hergestellte Serum enthält noch Spuren von Stoffen,

welche die Diphenylaminreaktion im Vergleich zu wässerigen Nitratlösungen abschwächen. Die Abschwächung beträgt etwa 10—26 %.

Zur quantitativen Bestimmung arbeitet man daher mit wässerigen Vergleichslösungen mit ausprobiertem Nitratgehalt.

Füllt man je 0,45, 0,85, 1,2, 1,5 und 2,0 ccm einer Lösung von 0,1871 g Kaliumnitrat im Liter unter Zusatz von 2 ccm gesättigter Kochsalzlösung mit destilliertem Wasser auf 100 ccm auf, so erhält man Vergleichslösungen, die für die Untersuchung des wie an gegebenen hergestellten Quecksilberchlorid-Salzsäure-Serums 1, 2, 3, 4, 5 mg N_2O_5 im Liter der untersuchten Milch entsprechen.

Über die Beziehungen des Lichtbrechungsvermögens und des spezifischen Gewichtes des Milchserums.

Von

Dr. Edwin Ackermann, Kantonschemiker in Genf.

[Eingegangen am 1. Juli 1911.]

Im August 1910 veröffentlichten Fendler, Borkel und Reidemeister eine Arbeit: „Ein Beitrag zur Refraktometrie des Chlorcalciumserums der Milch“¹⁾. Von 435 Milchproben haben sie die Refraktometerzahl des Chlorcalciumserums und das spezifische Gewicht des Essigsäureserums bestimmt und die Befunde in einer Tabelle nach den Refraktationswerten geordnet; sie erhielten so für die Refraktometerzahlen von 38,0—39,0 folgende Ergebnisse:

Refraktometerzahl des Chlorcal- ciumserums	Spezifisches Gewicht des Essigsäureserums			Zahl der Proben
	Höchster Wert	Niedrigster Wert	Unterschied	
38,0	1,0310	1,0281	0,0029	32
38,1	1,0303	1,0278	0,0025	37
38,2	1,0303	1,0275	0,0028	41
38,3	1,0309	1,0276	0,0033	34
38,4	1,0305	1,0276	0,0029	26
38,5	1,0302	1,0284	0,0018	21
38,6	1,0301	1,0291	0,0010	20
38,7	1,0305	1,0291	0,0014	20
38,8	1,0311	1,0292	0,0019	17
38,9	1,0312	1,0284	0,0028	13
39,0	1,0316	1,0293	0,0023	13

Für Milchproben mit gleicher Brechung des Chlorcalciumserums schwankten die Werte des spezifischen Gewichtes des Essigsäureserums um 0,0010—0,0033.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1910, 20, 156.