II.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

Eine neue Methode zur Bestimmung des Broms in kleinsten Mengen.

Von

Ernst Oppenheimer.

Bei meinen Untersuchungen (siehe die folgende Abhandlung), die sich mit der spezifischen Wirkung der Bromidionenwirkung beschäftigten, war ich auf eine quantitative Methode des Bromnachweises angewiesen, die besonders milligrammatische Mengen mit möglichst großer Genauigkeit zu erfassen gestattete. Unter den bisher bekannten erwies sich keine für die speziellen Zwecke geeignet.

Die älteste Brombestimmung, die die Halogene als Silberhalogenide fällt und mit dem Chlorstrom AgBr in AgCl umwandelt, und bei der aus dem Differenzgewicht die Menge des Broms zu berechnen ist, ist zwar zweifellos sehr exakt, aber zu umständlich und zeitraubend, und für kleinere Mengen zu ungenau. Sie ist von den wenigsten biologisch arbeitenden Autoren benutzt worden. Für die Methode von Jannasch¹⁾, der das Brom mit Kaliumpermanganat und Essigsäure von den übrigen Halogenen trennt, gilt das gleiche. Am häufigsten angewandt scheint die Methode von Berglund²⁾, wie sie Bönniger³⁾ und Frey⁴⁾ modifiziert haben. Die Methodik der Analyse von v. Wyß⁵⁾ hat Bernoulli⁶⁾ bereits einer Kritik unterzogen und gefunden, daß sie bei gleichzeitiger Anwesen-

1) Jannasch, zitiert nach Classen, Handb. d. quant. chem. Analyse. Stuttgart 1912, Enke.

2) Berglund, Methode, um Chlor und Brom qualitativ zu scheiden. Zeitschr. f. analyt. Chem. 1885, Bd. 24, S. 184.

3) Bönniger, Die Substituierung des Chlors durch Brom im tierischen Körper. Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. 1907, Bd. 4, S. 414.

4) Frey, Ernst, Die Ursache der Bromretention; Ein Vergleich der Brom- und Chlorausscheidung durch die Niere. Ebenda 1910, Bd. 8, S. 29.

5) v. Wyß, Über das Verhalten der Bromsalze im menschlichen und tierischen Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1906, Bd. 55, S. 263.

6) Bernoulli, Untersuchungen über die Wirkung der Bromsalze. Ebenda 1913, Bd. 73, S. 355.

heit von Cl wesentlich ungenauere Werte gibt als die Berglundsche. Ganz frei von diesem Fehler — da die Abspaltbarkeit ja nur graduell sich unterscheidet — ist aber auch die Berglundsche Analyse nicht. Ich bin selbst verschiedentlich auf das Berglundsche Verfahren zurückgekommen und konnte feststellen, daß ihre Verwertbarkeit stark von dem jeweiligen Verhältnis Cl:Br abhängt, daß ferner die Stärke und Dauer des Luftstroms, mit dem das durch Kaliumpermanganat und -pyrosulfat freigesetzte Br durch die JK-Vorlagen geführt wird, für das Ergebnis von wesentlicher Bedeutung ist. Mit dem von Bernoulli angegebenen Optimum von 30 Minuten bin ich nicht ausgekommen. Vorversuche bestimmten mich, die Reaktion erst nach $\frac{3}{4}$ —1 Stunde als beendet anzusehen. Daß ich anstatt mit 50 ccm einer 10- bzw. 5- und 2%igen JK-Lösung bei den derzeitigen Jodpreisen, auch mit einer Vorlage mit viel schwächerer Jodkalilösung, die außerdem noch eine überschlagsweise berechnete $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung enthielt, befriedigende Resultate erzielte, sei nebenbei bemerkt. Ein weiterer Umstand setzt der Berglundschen Analysenmethode eine Grenze. Für Brommengen unter 20 mg werden die Fehler nach meinen Erfahrungen, je bromärmer das Analysenmaterial wird, immer größer.

Daß die genannten Bestimmungsarten den Anforderungen für biologische Fragestellungen nicht vollauf genügen, hat schon Wünsche¹⁾ empfunden und aus dem gleichen Bedürfnis heraus eine neue Methode²⁾ eronnen und angegeben. Er ging von der Entdeckung Guareschis³⁾ aus, der 1913 feststellte, daß durch SO_2 entfärbtes Fuchsin (Schiffsches Reagens) durch Br tiefblauviolett gefärbt wird. Der qualitative Ausfall dieser Reaktion — und das schien das praktisch bedeutungsvollste an ihr — wird nach Aussage des Entdeckers durch die Anwesenheit von Cl und J so gut wie gar nicht gestört. Bei seinen rein qualitativen Untersuchungen ging Guareschi so vor, daß er das durch Oxydationsmittel entwickelte Br auf einen im

1) Wünsche, Eine neue Methode zur Bestimmung von Brom. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1919, Bd. 84, S. 328.

2) Mit der Methode Autenrieths⁴⁾ hat Wünsche wenig befriedigende Ergebnisse erzielt. Die Brombestimmung, die Gensler⁵⁾ benutzte, glaubte ich nicht prüfen zu müssen, da die neue Methode von Wünsche aus demselben Züricher Institut kommt, aus dem Genslers Mitteilungen stammen. Die Angaben von Pillat⁶⁾ erschienen erst, als meine Versuche weit vorgeschritten waren.

3) Guareschi, Neue, sehr scharfe, auch in Gegenwart anderer Halogene brauchbare Reaktion des Broms. Zeitschr. f. analyt. Chem. 1913, Bd. 52, S. 451.

4) Authenrieth, Die Bestimmung und Verteilung des Brom in Organen und im Blute nach Einnahme von Bromnatrium. Münch. med. Wochenschr. 1918, Bd. 65, S. 33.

5) Gensler, Über die Wirkung der Hypnotika (Neuronal) bei normalen und bei psychisch erregten Zuständen. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1914, Bd. 77, S. 164.

6) Pillat, Über einige Versuche, Brom in normalen menschlichen Organen nachzuweisen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1919, Bd. 108, S. 158.

Entwicklungsgefäß aufgehängten, mit SO_2 -Fuchsin getränkten, stärkefreien Filtrierpapierstreifen einwirken ließ. Wünsche glaubte, um die äußerst empfindliche Reaktion zur Beantwortung quantitativer Fragen heranziehen zu können, den Vorgang der Br-Entwicklung und die Reaktion des freien Br mit dem SO_2 -Fuchsin trennen und deshalb in zwei verschiedene Gefäße verlegen zu müssen. Um das Br von dem Entwicklungsgefäß in das eigentliche Reaktionsgefäß überzuleiten, benutzte er einen Luftstrom von bestimmter Stärke und Dauer. Die Einzelheiten des Verfahrens hier anzugeben, würde zu weit führen, es sei auf das Original selbst verwiesen.

Diese Methode hat in Wünsche's eigner Hand und bei Alday¹⁾ ausgezeichnete Resultate ergeben. Aber schon Alday, der die Methode unmittelbar von Wünsche übernahm, betont die Schwierigkeiten, mit denen die Ausführung des Verfahrens verbunden ist. Ich habe diese Schwierigkeiten: Herstellung gleichmäßiger, dauerhafter, genauer Vergleichslösungen, Verhinderung des Ausflockens des Reaktionsproduktes, Bestimmung der Beendigung der Reaktion — bloß um einige kurz zu erwähnen — trotz genauer Einhaltung der Vorschrift²⁾ so groß empfunden, daß ich nach über mehrere Wochen sich erstreckenden Vorversuchen die Anwendung der Methode von Wünsche aufgab. Über ihren analytischen Wert vermag ich daher kein Urteil abzugeben, doch scheint mir die Brauchbarkeit einer Methode im wesentlichen abhängig zu sein von der Leichtigkeit, mit der sie reproduziert werden kann.

Es bleibt Wünsche's Verdienst, erkannt zu haben, daß die Empfindlichkeit und Feinheit der Guareschischen Reaktion, die auch mich bestimmten, die Reaktion als Ausgangspunkt einer neuen Bestimmungsart beizubehalten, zur quantitativen Ausnutzung hervorragend geeignet ist. Meine Erfahrungen mit der Luftdurchleitung führten mich zuerst dazu, die Reaktion der Br-Entwicklung und Farbstoffbildung wieder in einem Gefäß sich abspielen zu lassen.

1) Alday, Beiträge zur Theorie der Narkose. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1919, Bd. 84, S. 339.

2) Bei der Herstellung der Fuchsinvorlagen hat Einhalten der Wünsche'schen Vorschriften übrigens wenig Zweck. Unter dem Namen Fuchsin geht im Handel so verschiedene Ware, daß man nie mit den gleichen Lösungen arbeiten wird, mit denen der Autor seine Reaktion angestellt hat. Prinzipiell ist das natürlich belanglos, da es sich im Grunde doch um eine vergleichende Methode handelt. Es sei nur deshalb darauf hingewiesen, weil durch den genannten Umstand sich vielleicht der Widerspruch erklärt, der zwischen Wünsche, der 6 Atome Br auf ein Molekül Fuchsin rechnet, und Guareschi, der eine Tetra-bromverbindung annimmt, besteht.

Dazu mußte auf ein Oxydationsmittel zurückgegriffen werden, das durch relative Farblosigkeit die Erkennung der violetten Br-Fuchsin-Verbindung nicht störte. Ein solches bot sich im Chlorwasser dar, bei dessen Verwendung folgendes festgestellt wurde. Gibt man zu einer durch H_2SO_4 angesäuerten NaBr-Lösung 1 ccm einer 0,1%igen SO_2 -Fuchsinlösung, dann tropfenweise Chlorwasser, so wird die Flüssigkeit intensiv violett, bei weiterem Cl-Zusatz grauviolett und schlägt bei einem gewissen Überschuß von Cl_2 deutlich in goldgelb um.

Den

chemischen Vorgang

bei der Reaktion haben wir uns dabei so zu denken: Cl_2 setzt aus HBr molekulares Br in Freiheit, das mit dem Fuchsin sofort Br-Fuchsin bildet. Bei Anwesenheit von weiterem Cl_2 wird, wahrscheinlich auf Grund von Massenwirkungen, das Br auch aus seiner Verbindung mit dem Fuchsin vertrieben und gleichzeitig Chlorfuchsin gebildet. Da über die Art der Verbindung zwischen Br und Fuchsin chemisch noch nichts ausgesagt werden kann, ist es schwierig, bei dem beschriebenen Vorgang zu zahlenmäßigen, exakten Vorstellungen zu gelangen. Ich möchte annehmen, daß sich in jedem gegebenen Fall zwischen violetterm Brom-Fuchsin und goldgelbem Chlor-Fuchsin ein Gleichgewichtszustand ausbildet, der von dem Mengenverhältnis vorhandenen Chlors und Broms abhängig ist und im Moment des Überwiegens von Cl_2 ganz auf seiten des Chlorfuchsins ruht. Die Erfahrung lehrt jedenfalls, daß, je mehr Br in der Lösung, desto mehr Cl bis zum Erscheinen des reingelben, violettfreien Farbentons erforderlich ist. Es lag nahe, diese Beobachtung einer »Titration« des Broms durch Cl_2 mit dem Fuchsin als Indikator zugrunde zu legen. Jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit besagten Vorgangs außerordentlich langsam. Beim Versuch, die Reaktion in der Wärme (Wasserbad 40–60°) vorzunehmen, erhält man durch die erhöhte Dampfspannung des Br ganz inkonstante Werte für den Cl_2 -Verbrauch. Eine Titration ließ sich also nicht durchführen, doch war daran zu denken, die einzelnen Momente des zeitlichen Ablaufs einer Titration von dem Moment der Br-Fuchsinbildung bis zu dem Augenblick, wo nur noch Chlor-Fuchsin vorhanden ist, in mehreren einzelnen Reagensgläsern festzuhalten, indem man zu gleichen Br-Mengen in jedes Glas verschiedene, und zwar steigende Mengen Cl_2 setzte. Aus der Chlormenge, die für das erste gerade ausgesprochen gelb erscheinende Glas verbraucht worden war, hätte man die gesuchte Brommenge tabellarisch oder rechnerisch bestimmen können. Leider bin ich aber weder rein empirisch, noch auf Grund theoretischer Überlegungen zur Aufstellung in diesem Sinne verwendbarer Gesetzmäßigkeiten gekommen. Die chemischen Vorgänge sind hier zu mannigfaltig, um sie differenzieren zu können. Der Einfluß von Nebenreaktionen, die beispielsweise durch die Gegenwart von SO_2 , durch das Entstehen von Chlorbrom bedingt sind, ist vorerst nicht zu übersehen.

Da mir vor allem daran gelegen war, auf möglichst kurzem Wege zu einer für biologische Fragen brauchbaren Bestimmung

kleiner Mengen Br zu gelangen, habe ich die Versuche in dieser Richtung vorläufig aufgegeben und das

Prinzip der Methode

in einen Vergleich zwischen dem Verhalten der zu prüfenden und einer bekannten Bromlösung verlegt. Erhielt ich mit einem bestimmten Volumen einer unbekannten Bromidlösung bei Zusatz von wechselnden, steigenden Mengen Cl_2 eine Farbenreihe von violett bis gelb, so mußte notwendigerweise der Br-Gehalt mit dem einer bekannten Bromlösung übereinstimmen, die unter gleichen Versuchsbedingungen mit den gleichen Cl_2 -Beträgen dieselbe Farbenreihe ergab. Die Herstellung einer Farbenreihe, bei geeigneten Mengenverhältnissen Cl_2 und Bromid, ist nicht schwer. Mit 3—4 Reagensgläsern mit gleichem Volumen einer NaBr-Lösung gewinnt man, bei richtiger Wahl, immer durch Zusatz gleichmäßig steigender Mengen des Oxydationsmittels eine Skala, die von Violett über die Übergangsfarben zu gelb führt. Die richtige Wahl kann man bequem treffen, wenn man zu Beginn der Analyse über den Chlorgehalt des Oxydans einigermaßen orientiert ist, wozu eine zahlenmäßige, etwa jodometrische Feststellung nicht einmal nötig ist. Auf welche einfache Weise diese Vorprüfung zweckmäßig vorzunehmen ist, wird bei der Ausführung beschrieben.

Die Hauptschwierigkeiten, um einen einwandfreien Vergleich vornehmen zu können, lagen vielmehr in dem Umstand, daß die zu prüfende Lösung eine Anzahl anderer Salze enthalten konnte, daß sie also nicht unter denselben Versuchsbedingungen stand, wie die Vergleichslösung. Doch ließ sich feststellen, daß die meisten Salze (der Ausnahme der Nitrite wird an anderer Stelle gedacht) für den Reaktionsausfall belanglos sind. Nur die Chloride sind wieder — wie bei den meisten Bromanalysen — die Ursache von Fehlern. Freilich äußert sich dieser Fehlerfaktor hier in umgekehrtem Sinn. Während wir bei anderen Methoden, wo wir Cl als Br mit analysieren, zu hohe Br-Werte erhalten, bedingt im vorliegenden Verfahren die Anwesenheit von Cl zu kleine Resultate. Zwei Ursachen dürften dafür verantwortlich gemacht werden. Die Chloride werden durch H_2SO_4 ebenso wie NaBr in seine Halogenwasserstoffprodukte (HCl) verwandelt und dieses muß die Dissoziation des HBr zurückdrängen und zweitens wird durch die Einwirkung von unterchloriger Säure, die sich sowohl im ursprünglich verwandten Chlorwasser, wie in dem später benutzten $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ findet, aus $\text{NaCl}:\text{Cl}_2$ entstehen. Es ist klar, daß dadurch im Sinne des oben besprochenen Vorgangs — weil eben mehr Cl_2 anwesend ist — die Bildung des Chlorfuchsin bei

einem geringeren Oxydanzsuzusatz eintritt, als bei einer gleichstarken, aber NaCl-freien Bromvergleichslösung. Es ist mir nicht gelungen, den Fehler so zahlenmäßig zu erfassen, um eine entsprechende Korrektur am Resultat anbringen zu können. Der Fehler steht weder mit dem absoluten Chlorgehalt, noch mit dem Verhältnis Cl/Br in Proportion. Innerhalb gewisser Grenzen ist aber erfahrungsgemäß der Fehler klein genug, um vernachlässigt werden zu können. Nach meinen Erfahrungen wird chloridfreies Material zweifellos am besten mit reiner NaBr-Lösung verglichen. Für Bestimmungen in kochsalzhaltigem Analysenmaterial mit NaCl-Mengen, wie sie die physiologischen Ausgangsstoffe mit sich bringen, hat sich mir eine Vergleichslösung am besten bewährt, die die 10fach äquimolare Menge des Bromids an Chloriden enthält.

An

Reagentien

werden somit gebraucht:

1. Vergleichslösung I: enthält in 1 ccm 1 mg Br, in 1 l H₂O 12,9 g chemisch reines NaBr. Vergleichslösung II: ebenfalls in 1000 ccm Aq. dest., 0: 12,9 g NaBr und 7,3 g NaCl.

2. Fuchsin-SO₂-Lösung: 100 ccm einer 1%igen Fuchsinlösung werden 80–90 mg frisch bereitetes, in Wasser aufgenommenes SO₂ zugesetzt; das ganze auf 1000,0 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird nach 24–36 Stunden farblos¹⁾ oder blaß gelblich und hält sich, kühl und dunkel aufbewahrt, wochenlang.

3. Oxydationsmittel. Statt des Chlorwassers, dessen Unbeständigkeit störend wirkt, benutze ich jetzt das Kalksalz der unterchlorigen Säure, das die chemische Fabrik »Griesheim Elektron« unter dem Namen »Caporit« in Handel bringt und von dem sie mir Proben in dankenswerter Weise überlassen hat. 1,0 g des leichtlöslichen, etwas über 40% Cl enthaltenden Pulvers, wird in 500,0 ccm Aq. dest. gelöst und filtriert.

4. 25% H₂SO₄. (HCl kann aus den bei Besprechung des Chlorfehlers hervorgehenden Gründen nicht benutzt werden. Außerdem enthält die Salzsäure des Handels — für den käuflichen Chlorkalk gilt dasselbe — stets etwas Br.)

5. Analysenmaterial. Die zu untersuchende Lösung enthalte das Brom als Bromalkali. Organische Stoffe werden deshalb alkalisch

1) Das Fuchsin »kleine Krystalle« erhielt ich durch Herrn Kertess von der Firma Casella & Co., Mainkur, wofür ihm auch hier bestens gedankt sei. Verwendet man unreines Fuchsin, läuft man in Gefahr, daß sich die Lösung nur mangelhaft oder noch langsamer entfärbt.

ohne Zusatz von Na_2O_2 und Salpeter verascht. Die Anwesenheit auch nur der geringsten Spuren Peroxyd oder Nitrit verhindert das Zustandekommen der Bromfuchsinverbindung. Alkoholische Lösungen sind unbrauchbar, da Aldehyde — wie Guareschi schon angibt — eine Br-Reaktion vortäuschen. Die Brom-Konzentration der zu untersuchenden Lösung (weiterhin X genannt) liegt zwischen 0,01 und 0,1%.

Der Übersicht halber teile ich die

Ausführung der Bestimmung

in vier Teile ein. Der erste Teil dient der bereits erwähnten, empirischen Feststellung der Stärke von C (Caporitlösung), bezüglich seiner Fähigkeit Br frei zu machen und aus dem Bromfuchsin Chlorfuchsin entstehen zu lassen. Die angegebene C-Lösung ist so beschaffen, daß mit 0,1 mg Br bei einem Zusatz von 0,2 oder 0,25 oder 0,3 ccm C einmal ein deutlich grauvioletter Farbenton entsteht. Es wird zu 3 Reagensgläsern mit je 0,1 ccm Vergleichslösung je 1 ccm Säure, dann zu den einzelnen Gläsern die genannten Volumina C, die man aus einer Mikrobürette mit 0,05 ccm Skalenteilung zufließen läßt, zugesetzt. Schließlich kommt zu jedem Glas 1 ccm Fuchsin- SO_2 . Eine der Proben wird grauviolett.

Mit dem Volumen von C, das den Übergangston ergeben hat, wird im zweiten Teil die approximative Bestimmung des Br in X vorgenommen, indem wir diese Menge C nacheinander mit 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 und wenn notwendig 1,0 ccm von X zusammenbringen, bis ein grauvioletter Ton auftritt oder eine Probe violett wird. (Die Reihenfolge der übrigen Zusätze ist ein für allemal dieselbe.) Haben wir so einen grauvioletten Reaktionsausfall erhalten, so wissen wir, daß in dem betreffenden Volumen ungefähr 0,1 mg Br sein wird. Fehlt der Übergangston und ist ein Inhalt gelb geworden, die nächste Probe violett, so ist klar, daß der Übergangston zwischen den zwei angewandten Volumina liegen muß. Ist 0,1 ccm schon violett, ist zu viel Br in X; die Lösung ist zu verdünnen. Ist 1,0 noch ausgesprochen gelb, so ist weniger als 0,1 mg Br vorhanden; ein Fall, der gesondert besprochen werden muß.

So kennen wir annähernd die Beziehungen von X und Cl_2 . Im dritten Teil wird zur Anstellung des Vergleichs mit dem aus Teil 2 sich ergebenden Volumen eine Farbenreihe — violett, grauviolett, gelb — hergestellt, die durch Zusatz wechselnder Mengen C entsteht. Beispielsweise: 0,25 ccm C hat mit 0,1 mg Br grauviolett gegeben, 0,3 ccm X mit 0,25 ccm C desgleichen, dann muß 0,3 ccm X mit 0,2 ccm C violetten und mit 0,3 ccm C gelben Reaktionsausfall ergeben.

Im vierten Teil werden solche Farbenreihen — ohne das Analysenmaterial nochmals in Anspruch zu nehmen — mit steigenden Mengen der Vergleichslösung — 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2 usw. mg Br — die man mit einer in $\frac{1}{100}$ ccm geteilten Pipette der Vorratsflasche entnimmt, hergestellt. Durch Nebeneinanderhalten der Farbenreihen von X aus Teil 3 und den entsprechenden aus Teil 4 kann dann abgelesen werden, daß soundsoviel ccm X mehr oder weniger mg Br enthalten als 0,1 bzw. 0,125 mg Br usw.

Ein

Beispiel

mag den Hergang deutlicher illustrieren.

(Zum Zwecke der leichteren Verständigung und Vereinfachung des Beispiels — aber nur zu diesem Zwecke — führe ich hier eine Zeichensprache ein. Es soll heißen: + = violett, — = gelb, $\pm$ = grau violett. Mit Einklammerungen und Fragezeichen werden noch feinere Schattierungen ausgedrückt. Es ist aber festzuhalten, daß stets die Gläser und Farben selbst verglichen werden müssen, nur so werden kleine Nuancenunterschiede erkannt. Die Farbenreihen mit gleichen Zeichen haben keineswegs den gleichen Bromgehalt, sondern können geringe Mengen mehr oder weniger enthalten, was bei direktem Vergleich nicht entgeht.)

Filtrat 14,5 ccm.

I. Teil: 0,1 mg Br mit 0,15 0,2 0,25 ccm C						} 1 ccm H ₂ SO ₄ und 1 ccm Fuchsin zu jedem Glas, das erste nach Füllung mit der Bromlösung, das zweite nach C-Zusatz.
ergibt + (±) —						
II. Teil: 0,1 ccm X mit 0,2 ccm C						
ergibt —						
0,2 ccm X mit 0,2 ccm C						
ergibt —						
0,5 ccm X mit 0,2 ccm C						
ergibt +						
± muß also zwischen 0,2 und 0,5 ccm liegen; daher im						
III. Teil: 0,3 ccm X mit 0,15 0,2 0,25 ccm C						
ergibt + (±) — } (I)						
IV. Teil: mg Br mit 0,15 0,2 0,25 0,3 0,35 ccm C						
0,1	+	(±)	—			(1)
0,125 ¹⁾	+	+	«(±)»	—		(2)
0,15		+	±	—		(3)
0,175		+	«(±)»	—		(4)
0,2			+	±	—	(5)

1 ccm H_2SO_4 und 1 ccm Fuchsin zu jedem Glas, das erste nach Füllung mit der Bromlösung, das zweite nach C-Zusatz.

1) Die Empfindlichkeit der Reaktion geht schon aus den Farbenunterschieden hervor, die Differenzen von 0,025 mg hinterlassen.

Vergleichen wir jetzt Reihe (I) mit (1) und (2), so erhellt aus den Gläsern mit 0,2 ccm C-Zusatz, daß (I) mehr Br enthält als (1) oder in 0,3 ccm X mehr als 0,1 mg Br sind; ferner, daß (I) weniger als (2) Br besitzt, mithin in 0,3 ccm X weniger als 0,125 mg Br sind.

Ergebnis: 0,3 ccm X = 0,1 — 0,125 mg Br.

Im Mittel, wie wir mit hinreichender Genauigkeit für physiologische Zwecke meist rechnen dürfen:

0,3 ccm = 0,112 mg Br; 1 ccm = 0,37³ mg; 14,5 ccm = 5,4¹ mg Br.

Gegeben waren: 5,5⁹ mg Br (7,2 mg NaBr).

In dem hier durchgeführten Beispiel liegen die Verhältnisse insofern günstig, als die Interpolation zwischen 0,1 und 0,125 mg zufällig in die Nähe des wirklichen Wertes 0,3 ccm = 0,11⁵ mg Br führt. Der wahre Br-Wert könnte, ohne daß es in unserem Ergebnis zum Ausdruck kommt, näher an 0,1 oder näher an 0,125 mg statt fast in der Mitte liegen. Das Gesamtergebnis würde dann, da die Einzelbeobachtung in unserem Fall mit $\frac{14,5}{0,3} = 48,3$ multipliziert werden

muß, unter anderen Bedingungen wesentlich schlechter ausfallen. Je kleiner die Gesamtbrommenge, desto kleiner natürlich der Fehler für das Endergebnis. Wenn es bei größeren Mengen aber auf größere Genauigkeit ankommt, könnte man den Fehler dadurch verkleinern, daß man, statt mit 0,1—0,2 mg Br zu arbeiten, größere Mengen nimmt. Aber das hat seine Grenze, weil, je höher man über 0,2 mg Br hinausgeht, der Vergleich dadurch ungemein erschwert wird, daß unter Beibehaltung der Cl₂-Konzentration und der Abstände von 0,05 ccm sich die Zahl der Gläser vermehrt, die Übergangstöne enthalten. Konzentriert man die Chlorklösung oder steigt man beim Ca(OCl)₂-Zusatz in größeren Raumteilabständen, so leidet wiederum die Empfindlichkeit der Bestimmung und nichts wäre damit gewonnen.

Man kann jedoch den erwähnten Fehler sehr gut herabsetzen und die Annäherung an den wahren Wert erhöhen, wenn man bei ausreichendem Analysenmaterial noch weitere Farbenreihen mit jeweils um $\frac{1}{10}$ ccm größerem Volumen von X darstellt und die vorhin rechnerisch ausgeführte Interpolation auf diese Weise sich experimentell selber regeln läßt.

Zu diesem Zweck werden im III. Teil noch Farbenreihen mit 0,4 und 0,5 ccm von X angefertigt.

0,4 ccm X mit	0,15	0,2	0,25	0,3 ccm C	} (II)
	+	+	±	—	

0,5 ccm X mit	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35 ccm C	} (III)
		+	+	(±)	—	

Vergleicht man (II) mit (3) und (4), so ergibt sich — was nicht aus den Zeichen (vgl. den Kleindruck zu Beginn des Beispiels) aber aus dem unmittelbaren Vergleich hervorgeht —, daß 0,4 ccm X etwas mehr als 0,15 und weniger als 0,175 mg Br, daß ferner aus Vergleich von (III) mit (4) und (5) 0,5 ccm X mehr als 0,175 und weniger als 0,2 mg Br enthalten. Damit sind uns 3 Ungleichungen gegeben:

$$\begin{array}{rclclcl} 0,1 & \text{mg Br} & < & 0,3 \text{ ccm X} & < & 0,125 \text{ mg Br} \\ 0,15 & \text{» »} & < & 0,4 \text{ » »} & < & 0,175 \text{ » »} \\ 0,175 & \text{» »} & < & 0,5 \text{ » »} & < & 0,2 \text{ » »} \end{array}$$

die wir auf 0,1 ccm umrechnen

$$\begin{array}{rclclcl} 0,033 & \text{mg Br} & < & 0,1 \text{ ccm X} & < & 0,042 \\ \boxed{0,0375} & \text{» »} & < & 0,1 \text{ » »} & < & 0,044 \\ 0,035 & \text{» »} & < & 0,1 \text{ » »} & < & \boxed{0,04} \end{array}$$

Die sich am nächsten liegenden Werte der linken und rechten Seiten müssen dem wahren Wert sich am besten nähern.

$$\begin{array}{l} 0,1 \text{ ccm} = 0,0375 \text{ — } 0,40 \text{ mg Br; im Mittel für } 1,0 \text{ ccm} \\ 1,0 \text{ » } = 0,387 \text{ mg Br} \\ \text{für } 14,5 \text{ » } = 5,61 \text{ » »} \end{array}$$

Der wahre Wert unseres Beispiels ist 0,38⁵ bzw. 5,5⁹ mg, dem wir uns auf diese Weise erheblich mehr genähert haben, als mit der einmaligen Beobachtung mit dem Ergebnis 0,37³ bzw. 5,4¹ mg Br. (Statt des Mittelwerts ziehe ich vor, die beiden Grenzwerte anzugeben.)

Einer besonderen Erwähnung bedarf noch der Zeitpunkt, in dem die Farbenreihen verglichen werden sollen. Angesichts der bereits erwähnten geringen Reaktionsgeschwindigkeit, darf nicht umgehend nach dem Fuchsinzusatz der Vergleich vorgenommen werden. Der Endzustand des chemischen Vorgangs ist immer abzuwarten. Andererseits dürfen ältere Farbenreihen nicht mit frischen verglichen werden. Die Farbblösung hält sich nämlich nicht, sie flockt aus, so daß man nach Stunden zu Boden sitzende, flockige Farbstoffteilchen und eine überstehende, farblose, klare Flüssigkeit vor sich hat. Es geht natürlich nicht an, zwischen eben hergestellten und ausflockenden oder ausgeflockten Farbenreihen Vergleiche zu ziehen. Man vergleiche also Farbenskalen innerhalb 20 Minuten nach ihrer Herstellung. Da jedoch die Farbflocken ganz ausgezeichnet die einzelnen Farbqualitäten wiedergeben, ist es auch möglich, den Vergleich nach 12 bis 24 Stunden anzustellen. Man verfährt dabei genau so wie bei den Lösungen, nur ist Vorsorge zu treffen, daß man beim Ansetzen des

Versuchs alle etwa in Betracht kommenden Reihen von 0,1 bis 0,2 oder 0,3 Br fehlerlos anfertigt. Eine Nachlieferung eines oder mehrerer Gläser zur Vervollständigung ist nicht statthaft, da in dem inzwischen verstrichenen Zeitraum die Caporitlösung sich mit Sicherheit etwas verändert hat und damit die Versuchsbedingungen geändert sind. In solchen Fällen wäre die ganze Analyse zu wiederholen.

Bei einer Konzentration von 0,1 mg in 1 ccm braucht man zur Bestimmung wenigstens 6—7 ccm, was dann einem Gesamtgehalt von 0,6—0,7 mg Br entspricht. Da man aber, wenn statt 1 ccm Fuchsin nur 0,5 ccm zugesetzt werden und auch die Menge des Oxydans auf 0,05 und 0,1 ccm heruntergeht, noch im Notfall Farbenreihen mit 0,04, 0,05 und 0,075 g Br erhält, kann man gelegentlich auch noch eine Gesamtmenge von 0,4 mg Br als unterste Grenze quantitativ erfassen.

Der Umstand, daß bei meiner Methode verschiedene Farbdichten verglichen werden, da ja Vergleichslösung und zu prüfende Lösung in verschiedenen Volumina verwandt werden, ist nach meiner Erfahrung belanglos. Zu beiden Vergleichsobjekten kommt soviel Flüssigkeit (Säure, Fuchsin und Caporit), daß der Unterschied in der Farbdichte praktisch ausgeglichen wird.

Schließlich sei noch hervorgehoben, daß der quantitative Nachweis¹⁾ von Br bei einer Verdünnung von 2:100 000 in 1 ccm gut gelingt. (Walter²⁾ gibt mit der Guareschischen³⁾ Originalmethode 1:10 000 an.) Man ändert für diesen Fall die Reihenfolge der Zusätze, indem man der angesäuerten Br-Lösung erst 0,4 ccm Fuchsin-SO₂, dann tropfenweise Caporit zusetzt. Bei 0,02 mg Br in 1 ccm entsteht ein deutlicher violetter Ring.

Zum Schluß folgen einige Analysenresultate. Auf Wiedergabe weiterer, ausführlicher Beleganalysen muß ich, da die Methode kurze, eindeutige Protokolle nicht gestattet, angesichts der derzeitigen Raumnot verzichten.

Die Anwendung der Methode wird vor allem für kleine Br-Mengen angezeigt sein, denn erstens versagen für diese die übrigen Bestimmungen und zweitens liefert sie, wie aus der Tabelle ersichtlich, gerade bei Mengen von 2—12 mg, die günstigsten Resultate.

1) Daß Walter²⁾ jüngst auch im Goldchlorid ein empfindliches Reagens auf Br gefunden hat, sei erwähnt.

2) Walter, Untersuchungen über die Permeabilität der Meningen. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. 1919, Bd. 47, S. 380.

3) Guareschi, s. S. 18.

Versuch Nr.	Material	Filtrat bzw. Lösung in ccm	Gefunden Br		Gegeben Br in mg
			Grenzwerte in mg	Mittelwerte in mg	
5	15 mg NH_4Br in 10 ccm Serum	9,5	—	11,5	12,2
6	4,4 mg Bromhexahydrobenzolsäureamid	4,2	—	1,68	1,71
7	6,5 mg Bromhexahydrobenzolsäureamid	6,5	—	2,1	2,52
W ₀	71,0 mg NaBr in physiologischer NaCl-Lösung	26,8	—	56,9	55,2
W ₁	8,8 mg NaBr in physiologischer NaCl-Lösung	17,4	—	6,2	6,9
W ₂	7,43 mg NaBr in physiologischer NaCl-Lösung	16,3	5,73—6,56	6,14	5,77
W ₃	4,0 mg NaBr in NaCl-Lösung unbekannter Konzentration	24,5	3,06—3,43	3,24	3,1
W ₄	13,0 mg NaBr in NaCl-Lösung unbekannter Konzentration	20,4	10,1—10,5	10,3	10,0
W ₅	15,0 mg NaBr in NaCl-Lösung unbekannter Konzentration	30,5	11,4—12,2	11,8	11,7
P ₁	44,0 mg NaBr in Aq. dest.	50,0	28,7—35,1	31,9	34,2
W ₆	9,66 mg NaBr in etwa 15% NaCl-Lösung	15,0	—	6,6	7,5
O ₁	20,4 mg Br als NaBr aus einer NaCl-freien Lösung	39,5	—	19,2	20,4
O ₂	22,0 mg Br als NaBr aus einer NaCl-haltigen Lösung	41,0	20,0—23,2	21,75	22,0
W ₇	16,9 mg NaBr in 0,73% NaCl-Lösung	14,8	7,45—8,19	7,82	8,5
W ₈	16,9 mg NaBr in Aq. dest.	24,4	8,5—9,4	8,9	8,5
W ₉	3,3 mg NaBr in Frosch-Ringer	8,0	—	2,58	2,5
W ₁₀	9,9 mg NaBr in Aq. dest.	16,4	8,0—8,25	8,1	7,7

Anmerkung bei der Korrektur. Auf die kürzlich erschienene Arbeit von G. Hartwich, »Eine neue Methode quantitativer Brombestimmung«¹⁾ stieß ich erst während der Drucklegung meiner Arbeit. Die Hartwichsche Methode, die zum Teil in den Grundlagen mit der beschriebenen Methodik übereinstimmt, scheint sehr gute Resultate zu ergeben. Ob sie sich auch für kleinste Br-Mengen eignet, müßte noch geprüft werden.

1) Bioch. Ztschr. 1920, Bd. 107, S. 202.