

Eine neue volumetrische Bestimmung des Natriums im Blutserum.

Von

Stefan Rusznyák und Ella Hatz.

(Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik der Kgl. Ungar. Franz-Josef-Universität, Szeged.)

(Eingegangen am 2. Juli 1932.)

Es zeigte sich schon seit langem das Bedürfnis nach einer schnellen, womöglich volumetrischen, Natrium-Bestimmungsmethode, die nicht nur zur Bestimmung kleiner Mengen Natriums geeignet, sondern auch in Fällen anwendbar ist, bei denen es sich um die Bestimmung des Natriums in organogenen Stoffen (z. B. Blutserum) handelt.

Die bisher zumeist üblichen Methoden von *Kramer* und *Tisdall*¹, ferner von *Kramer* und *Gittleman*² können nämlich kaum als einwandfrei betrachtet werden, da — wie allbekannt — die Ausfällung des Natriumhydroxyantimoniats nicht quantitativ verläuft, was besonders im Falle geringer Natriummengen einen sehr groben Fehler verursachen kann. Übrigens kann bei diesen Verfahren die störende Wirkung von freier Säure (Ausfällung von amorpher Antimonsäure!), ferner gewisser Kationen (z. B. Ca, Mg) nicht vernachlässigt werden³, so daß die Resultate auch schon deswegen keine exakte Gültigkeit haben können.

In letzterer Zeit wurden mehrere Natriumbestimmungsmethoden bekannt, deren Prinzip auf der Abscheidung des Natriums als in wässrig-alkoholischem Medium praktisch unlösliches Uranyl-magnesium-natriumacetat oder Uranyl-zink-natriumacetat beruht. Durch Wägung des Niederschlages oder volumetrische Ermittlung seines Urangehaltes konnte die Bestimmung des Natriums schon mit beruhigender Genauigkeit vor sich gehen⁴. All diese Methoden sind jedoch teils etwas zu langwierig für die

¹ J. of biol. Chem. 46, 339, 1921.

² Ebenda 62, 353, 1924; siehe auch *Rourke*, ebenda 78, 337, 1926.

³ Deshalb wurde von *Bálint* (diese Zeitschr. 150, 424, 1924) die vorangehende Veraschung des Serums vorgeschlagen.

⁴ Siehe die Methoden von *A. Blanchetière*, Bull. soc. Chim. Fr. 33, 807, 1923; *A. Kling* u. *A. Lasieur*, Brit. Chem. Abstr. 20, 3144, 1926; *H. H. Barber* u. *J. M. Kolthoff*, Zeitschr. f. anal. Chem. 76, 470, 1929; *E. Kahane*, Bull. Soc. chim. Fr. [4], 47, 382, 1930; *A. Nau*, Zeitschr. f. anal. Chem. 73, 311, 1928; *H. Gall* u. *K. H. Heinig*, Chem. Centralbl. 1932, I, 710; *F. J. Dobbins* u. *R. M. Byrd*, J. Amer. chem. Soc. 53, 3288, 1931; *E. R. Caley*, ebenda 52, 1349, 1930; *Grabar*, Bull. Soc. de Chem. Biol. 11, 58, 1929.

klinische Laboratoriumspraxis, teils aber nicht geeignet zur einwandfreien Bestimmung solch kleiner Mengen Natrium, wie sie in den in Betracht kommenden organogenen Stoffen enthalten sind. Durch *R. A. McCance* und *H. L. Shipp*¹ wurde zwar — auf dem Prinzip der Abscheidung des Natriums als Uranyl-zink-natrium-acetat beruhend — ein kolorimetrisches Verfahren ausgearbeitet, das zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Natrium wohl geeignet erscheint, doch ist diese Methode nicht frei von den bekannten Nachteilen der kolorimetrischen Methoden.

Es gelang uns, eine volumetrische Natrium-Bestimmungsmethode zu finden, die nicht nur ein schnelles Arbeiten gewährleistet, sondern sich auch durch ihre erprobte große Genauigkeit auszeichnet.

Unsere Methode ist auf die Anwendung des von *J. M. Kolthoff*² vorgeschlagenen speziellen Reagens für Natrium gegründet. Dieses Reagens besteht aus einer wässerig-alkoholischen Lösung von Uranyl- und Zinkacetat und weist ein ziemlich stark ausgeprägtes spezifisches Verhalten gegenüber Natriumionen auf.

Das Prinzip unseres Verfahrens kann kurz in folgendem zusammengefaßt werden: Die zu untersuchende Lösung wird im Überschuß mit dem Uranylreagens versetzt. Nach ungefähr halbstündigem Stehen ist dann die quantitative Abscheidung des Natriums als Uranyl-zink-natrium-acetat $[(UO_2)_3ZnNa(CH_3COO)_9 \cdot 6H_2O]$ sicher vollendet. Der Niederschlag wird nun in heißem Wasser gelöst und in der wässrigen Lösung das Uranylion volumetrisch bestimmt. Zur volumetrischen Bestimmung des Uranylions dienen zwar mehrere Methoden, doch können für unsere Zwecke selbstverständlich nur diejenigen in Betracht kommen, die eine Mikrobestimmung des Uranylions ermöglichen. — Wir konnten unter den bekannten Bestimmungsarten keine geeignete Schnellmethode finden. Da das Uranylion aus schwach saurer Lösung auf Einwirkung von Hydrophosphationen quantitativ als Uranyl-hydrophosphat ausfällt, versuchten wir auf diesem Wege — also durch Bestimmung des Überschusses der Phosphationen — die Frage zu lösen, was uns auch tatsächlich gelang. Die volumetrische Bestimmung des Phosphations kann mit Hilfe einer Uranylacetatlösung vorgenommen werden, wobei Cochenille als Indikator benutzt wird.

Diese Art der Phosphatbestimmung wurde schon durch *F. Repiton*³ ausgearbeitet; die richtige Deutung derartiger Indikationen wurde aber erst viel später durch *K. Fajans* und *O. Hassel*⁴ gegeben. Laut *Pollák*⁵ gehört nämlich die *Repitonsche* Phosphatbestimmung ebenfalls in die Reihe der *Fajansschen* Indikationen.

¹ Biochem. J. 25, 449, 1931.

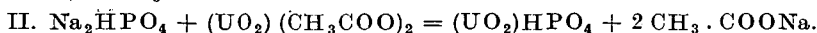
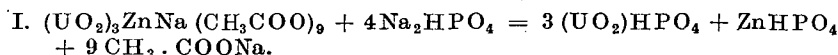
² Zeitschr. f. anal. Chem. 70, 397, 1927.

³ Chem. Centralbl. 1907, II, 2078.

⁴ Zeitschr. f. Elektrochem. 29, 495, 1923.

⁵ *L. Pollák*, „Fajans-féle titrálási módszerek“, S. 24. Szeged 1931. (In ungarischer Sprache verfaßte Dissertation.)

Der Verlauf der bei unserem Verfahren sich abspielenden Reaktionen kann durch folgende Gleichungen wiedergegeben werden:



Wir können aus der ersten Gleichung herauslesen, daß vier Moleküle Dinatriumhydrophosphat einem Atomgewicht Natrium entsprechen. 1 ccm m/20 Dinatriumhydrophosphatlösung ist demnach 0,287 mg Natrium äquivalent.

Die Anwendbarkeitsbedingungen des *Kolthoffschen* Reagens wurden schon von anderer Seite weitgehend geklärt, so daß es uns überflüssig erschien, auf derartige Untersuchungen einzugehen. Vollständigkeithalber sei hier erwähnt, daß die Gegenwart von Ca, Mg, Sr, Ba, Fe, NH_4 , Li und K (letzteres bis zur 30fachen Menge des anwesenden Natriums) die Bestimmung nicht schädlich beeinflussen. Sind in der Lösung des Natriumsalzes störende Komponenten vorhanden (z. B. im Blutserum), so müssen diese vor der Abscheidung des Natriums entfernt werden. Da im zur Natriumbestimmung vorbereiteten Blutserum Phosphate anwesend sind und diese mit dem Natrium zusammen (als Uranylphosphat) ausfallen würden, so muß man für ihre vorherige Abscheidung stets Sorge tragen. Dies kann am zweckmäßigsten mit einer alkoholischen Zinkacetatlösung geschehen.

Ausführung der Bestimmung.

I. Erforderliche Reagenzien.

1. *Alkoholische Zinkacetatlösung*¹. Da das käufliche Zinkacetat stets immer auch etwas Natrium enthält, ist es zweckmäßig, die Bereitung des Reagens folgenderweise vorzunehmen: Man scheidet aus einer heiß gesättigten wässrigen Lösung von Zinksulfat (pro anal.) in der Siedehitze mittels überschüssigem Ammoniumhydroxyd ($D = 0,880$) einen Niederschlag von Zinkhydroxyd ab. Der Niederschlag wird filtriert, auf der Porzellannutsche mit heißem Wasser gewaschen und schließlich scharf abgesaugt. Nun wird der Niederschlag portionsweise in 12½ ccm Eisessig eingeführt, und zwar in geringem Überschuß. Die so gewonnene stark konzentrierte Zinkacetatlösung wird filtriert und ihr Volumen mit Wasser auf 100 ccm ergänzt. Diese Lösung wird mit 3 ccm konzentriertem Ammoniumhydroxyd und hierauf mit 300 ccm 96%igem Alkohol versetzt.

2. *Uranyl-zinkacetatlösung*². 10 g reinstes Uranylacetat und 30 g Zinkacetat werden in 50 ccm 4%iger bzw. 50 ccm 2%iger Essigsäure heiß gelöst und die beiden Lösungen noch heiß vereinigt. Man kocht abermals kurz auf und versetzt die Lösung, nachdem sie abgekühlt ist, mit 100 ccm 96%igem Alkohol. Das Reagens wird zweckmäßig im Eisschrank aufbewahrt.

¹ Vgl. R. A. McCance u. H. L. Shipp, a. a. O.

² J. M. Kolthoff, Zeitschr. f. anal. Chem. 70, 397, 1927.

3. *Gesättigte alkoholische Uranyl-zink-natriumacetatlösung.* Man scheidet einen Acetatniederschlag (s. weiter unten) aus einer reinen Natriumchloridlösung ab und suspendiert diesen — nach wiederholtem Waschen am Filter mittels Alkohol — in 96 %igem Alkohol, läßt stehen und dekantiert oder filtriert die klare Lösung ab.

4. *Cocheñillelösung*¹. Man kocht ungefähr 2 g Cocheñillepulver mit 100 ccm Wasser am Rückflußkühler 1 Stunde lang, filtriert die Lösung noch heiß ab und versetzt das Filtrat — nach Erkalten — mit 50 ccm 96 %igem Alkohol.

5. *m/20 Uranylacetatlösung.*

6. *m/20 Dinatriumhydrophosphatlösung.*

II. Die Enteiweißung des Blutserums.

Die Vorbereitung des Blutserums zur Natriumbestimmung besteht aus einer Enteiweißung, welche auf zweierlei Weise [a) und b)] erfolgen kann. Die einfachere Art ist, daß man die Eiweißstoffe mittels Trichloressigsäure ausfällt und in der filtrierten klaren Lösung die Natriumbestimmung vornimmt. Da wir es aber für nicht ausgeschlossen hielten, daß mit den ausgefallenen Eiweißstoffen etwas Natrium in Verlust gehen kann, führten wir an dem Serum auch eine „nasse Verbrennung“ aus, bei der die ganze Menge des Natriums unbedingt verlustlos erhalten werden kann. Die auf beide Weisen erhaltenen Resultate stimmten untereinander sehr gut überein, was jedoch die Möglichkeit nicht ausschließt, daß in gewissen Fällen die Ausfällung der Eiweißstoffe Natriumverluste mit sich bringen kann. Die bezügliche Untersuchungen sind noch im Gange.

a) 2 ccm Serum werden in einem Meßkolben von 10 ccm Inhalt mit 5 ccm 12 %iger Trichloressigsäure versetzt. Nach 5 Minuten Stehen wird mit Wasser bis zur Marke ergänzt, gründlich durchgeschüttelt und durch ein trockenes Filter in ein trockenes Reagensglas filtriert.

b) 2 ccm Serum werden in einem „Duran“-Reagensglas (etwa 16 × 180 mm) mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und über einer kleinen Flamme bis zum Auftreten weißer Schwefelsäuredämpfe erwärmt. Man läßt ein wenig abkühlen und setzt nach Zugabe von 6 Tropfen konzentrierter Salpetersäure ($D = 1,42$) das Erwärmen — wiederum bis zum Auftreten der stechend riechenden weißen Schwefelsäuredämpfe — fort. Diese Operation wird nun zwei- bis dreimal wiederholt, bis eine vollkommen klare, schwach gelblich gefärbte Lösung entsteht. Schließlich wiederholt man das Erwärmen nach Zugabe von zwei bis drei Tropfen Wasserstoffperoxyd (*Merck*, pro anal., unkonserviert!) noch zweimal nacheinander, wobei immer bis zum Erscheinen der Schwefelsäuredämpfe erwärmt wird. Nach vollständigem Abkühlen wird an der Mündung des Reagensglases von außen eine ganz dünne Schicht Vaseline aufgetragen und hierauf die Lösung durch einen Kapillartrichter in einen Meßkolben von 25 ccm Inhalt übergossen. Man spült das Reagensglas mittels einer dünnstrahligen Spritzflasche fünf- bis sechsmal mit je 2 bis 3 ccm Wasser aus und führt die Waschflüssigkeiten ebenfalls in den Meßkolben ein. Die Lösung wird mit Wasser bis zur Marke ergänzt.

¹ *F. Repiton, a. a. O.*

III. Die Entfernung der Phosphate.

2 ccm des nach a) oder b) vorbereiteten Serums werden in einem Zentrifugenröhrchen von 15 ccm Inhalt mit 4 ccm alkoholischer Zinkacetatlösung (1.) versetzt und 2 bis 3 Stunden stehengelassen. Nach kurzem Zentrifugieren werden aus der klaren Lösung 3 ccm entnommen und in ein anderes Zentrifugenröhrchen überführt.

IV. Die Abscheidung des Natriums.

Die 3 ccm der vorher gewonnenen phosphatfreien Lösung werden mit Hilfe eines ganz dünnen Glasstäbchens (dessen Benetzungsrückstand mit wenigen Tropfen Alkohol zur Lösung zurückgewaschen wird) mit 7 ccm Uranylreagens (2.) vermischt. Man läßt $\frac{1}{2}$ Stunde im Eisschrank stehen, zentrifugiert und saugt die klare Lösung mit Hilfe eines dünnen, am Ende zurückgebogenen Glasrohres ab. Der zurückbleibende Niederschlag wird in 5 ccm gesättigter alkoholischer Uranyl-zink-natriumacetatlösung (3.) durch Schütteln gründlich aufgeschwemmt, zentrifugiert und die klare Lösung — wie vorher — abgesaugt. Nun wird der Niederschlag mit 10 bis 15 ccm heißem Wasser in ein *Erlenmeyer*-Kölbchen gewaschen und die so erhaltene Lösung nach Zugabe von 3 ccm m/20 Dinatriumhydrophosphatlösung (6.) kurz aufgekocht. Nach Zusatz von zwei Tropfen Cochenillelösung (4.) wird noch in der Hitze mit m/20 Uranylacetatlösung (5.) titriert. Cochenille bewirkt anfangs eine intensiv rötliche Färbung, die, während der Titration von einem grünlichen Stich begleitet, allmählich heller wird. Der Endpunkt läßt sich — nach einiger Übung — mit seiner ausgeprägt grünen Farbe sehr scharf beobachten.

Die Titerstellung der Dinatriumhydrophosphatlösung geschieht unmittelbar mit einer aus Uranylacetat pro anal. mit größter Sorgfalt bereiteten m/20 Uranylacetatlösung. Es sei hier bemerkt, daß wir diese Titerstellung auch auf gravimetrischem Wege kontrolliert haben (Abscheidung des Phosphats als Magnesium-ammoniumphosphat und Wägung desselben als Magnesium-pyrophosphat) und einen mit dem volumetrisch ermittelten vollkommen übereinstimmenden Faktor erhielten. Natürlich muß auf die Reinheit des Uranylacetats großes Gewicht gelegt werden.

Die Berechnung. a) Da zur Ausfällung des Natriums schließlich 0,2 ccm des Serums gelangen, muß der gefundene Wert mit 500 multipliziert werden, um die Menge des Natriums in 100 ccm Serum angeben zu können. Die Berechnung wird demnach nach folgender Formel ausgeführt:

$$(a \cdot f - b) 0,287 \cdot 500 = \text{mg Na pro 100 ccm Serum,}$$

wo „a“ die Kubikzentimeterzahl der zugegebenen m/20 Dinatriumhydrophosphatlösung, „f“ den Faktor derselben und „b“ die Kubikzentimeterzahl der verbrauchten m/20 Uranylacetatlösung bedeutet.

b) Es gelangten insgesamt 0,08 ccm Serum zur Fällung des Natriums so daß der gefundene Wert mit 8 dividiert und mit 10000 multipliziert werden muß, um die Menge des Natriums in 100 ccm Serum angeben zu können. Die der Berechnung zugrunde liegende, etwas vereinfachte Formel ist die folgende:

$$(a \cdot f - b) 359,32 = \text{mg Na pro 100 ccm Serum,}$$

wo die Bedeutung der Buchstaben dieselbe ist wie bei a).

Wir haben unsere Ergebnisse in den zwei unten angeführten Tabellen zusammengefaßt.

Tabelle I.

Na Cl-Lösung		m/20 Na ₂ HPO ₄ ccm	m/20 Uranyl- acetat ccm	Gefunden Na mg	Berechnet Na mg	Abweichung mg
ccm	%					
1	0,1	3	1,633	0,393	0,393	0,000
1	0,1	3	1,640	0,390	0,393	- 0,003
2	0,05	3	1,623	0,396	0,393	+ 0,003
2	0,05	3	1,623	0,396	0,393	+ 0,003
1	0,05	2	1,339	0,190	0,196	- 0,006
1	0,05	2	1,297	0,202	0,196	+ 0,006
1	0,025	2	1,661	0,095	0,098	- 0,003
1	0,025	2	1,628	0,107	0,098	+ 0,009

In Tabelle I sind die Daten einiger Analysen zusammengestellt, die an einer reinen Natriumchloridlösung ausgeführt wurden. Außer Bestimmungen, die an reinem Serum (nach vorangehender „nasser Verbrennung“ bzw. Enteiweißung mittels Trichloressigsäure) ausgeführt wurden, haben wir auch Versuche angestellt, bei denen das Serum mit einer bestimmten Menge einer Natriumchloridlösung von bekannter Konzentration versetzt wurde. Wir haben die Daten dieser Versuche in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II.

Serum		Zuge- gebenes Na Cl %	m/20 Na ₂ HPO ₄ ccm	m/20 Uranyl- acetat ccm	Gefunden Na %	Berechnet Na %	Abweichung
„nass ver- brannt“ ccm	entei- weißt ccm						
—	0,2	—	5	2,636	0,338	—	—
—	0,2	—	5	2,616	0,342	—	—
0,2	—	—	5	2,667	0,335	—	—
0,2	—	—	5	2,677	0,334	—	—
—	0,2	—	5	2,955	0,294	—	—
—	0,2	—	5	2,975	0,291	—	—
0,08	—	—	5	4,194	0,289	—	—
0,08	—	—	5	4,153	0,304	—	—
—	0,2	—	5	2,700	0,330	—	—
—	0,2	—	5	2,680	0,333	—	—
—	0,2	0,039	5	2,448	0,368	0,370	- 0,002
—	0,2	0,039	5	2,430	0,369	0,370	- 0,001
—	0,2	—	5	2,705	0,330	—	—
—	0,2	—	5	2,766	0,321	—	—
—	0,2	0,078	5	2,225	0,399	0,403	- 0,004
—	0,2	0,078	5	2,195	0,403	0,403	0,000

Wie aus den Daten der zwei Tabellen ersichtlich, liefert unsere Methode vollkommen befriedigende und zuverlässige Resultate.