

# Zum Nachweis kleinster Wismutmengen im Harn.

Von **H. K. Barrenscheen** und **Margarete Frey**.

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 5. Juli 1929.)

Die Einführung des Wismuts in die Therapie der Lues hat den medizinischen Chemiker vor die Aufgabe gestellt, geringe Mengen des Metalls in den Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen des Organismus nachzuweisen. Es hat sich denn auch eine nicht unbeträchtliche Literatur auf diesem Gebiete entwickelt, welche der Aufgabe mit verschiedenen Methoden gerecht zu werden versuchte, wobei die sonst in der Analytik geübte Arbeitsweise dem biologischen Material angepaßt wurde. So ist von AUBRY<sup>1)</sup> die Reaktion von LÉGER — Fällung des Wismuts als Chinin-Wismut-Kaliumjodid — zu diesem Zwecke herangezogen worden. Von AUBRY selbst wird die Empfindlichkeit der Reaktion mit 1 : 600.000 angegeben. Ihre direkte Anwendung auf den Harn ist jedoch nur bei relativ großen Mengen Wismut möglich und kann häufig, namentlich bei konzentrierteren Harnen zu Irrtümern Anlaß geben. Will man sicher gehen, so muß man wohl nach Zerstörung der organischen Substanz durch Salpetersäure-Schwefelsäure oder Chlorat-Salzsäure das Wismut als Sulfid fällen und die Reaktion in der Lösung des Sulfidniederschlages ausführen. In dieser Weise durchgeführt, ergibt die Reaktion brauchbare Resultate, doch ist die Methode zeitraubend und verlangt relativ viel Material. Nach anderen Prinzipien geht GANASSINI<sup>2)</sup> vor, welcher, soweit aus dem uns zugänglichen Referat ersichtlich ist, die Ausfällung des Wismuts durch Schwefelwasserstoff als nicht beweisend ablehnt und statt dessen das Wismut mit Ammoniak fällt und die Reduktion mit alkalischer Stannitlösung nach VANINO und TREUBERT<sup>3)</sup> zu metallischem Wismut durchführt. Eine Identifizierung erreicht er durch Überführung in Rubidium-Wismutjodid nach BEHRENS oder in Wismutjodid nach KOBELL und CORNWALL. LABAT und PÉRY<sup>4)</sup> lehnen ihrerseits wieder die

<sup>1)</sup> AUBRY, Journ. Pharm. et Chim. 1922, 25, 15—18.

<sup>2)</sup> GANASSINI, Ref. Centralbl. 1923, II., 78.

<sup>3)</sup> VANINO und TREUBERT, B. 31, 1113, 2267, 1898.

<sup>4)</sup> LABAT und PÉRY, Ref. Centralbl. 1924, IV., 2193.

Reaktion von GANASSINI ab und schlagen folgenden Weg ein: Nach Zerstörung der organischen Substanz mit  $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{SO}_4$  fällen sie das Wismut als Sulfid mit  $\text{H}_2\text{S}$  und prüfen nach Zerlegung des Sulfidniederschlags mit Salpetersäure mit Hexamethylentetramin, wobei sie auf eine Empfindlichkeit von 0,002 mg kommen wollen. Mit der quantitativen Bestimmung und den Ausscheidungsverhältnissen befaßt sich schließlich eine Reihe von Arbeiten von H. MÜLLER und KÜRTHY<sup>5)</sup>, ohne jedoch für den Nachweis des Wismuts neue Gesichtspunkte beizubringen.

Vor kurzem hat nun F. FEIGL<sup>6)</sup> einen äußerst empfindlichen und eleganten Nachweis von geringen Wismutspuren durch die induzierte Reduktion von Bleisalzen angegeben. Es erschien uns aussichtsreich, diese einfache und dabei einwandfreie Reaktion auf ihre Anwendungsmöglichkeit für biologisches Material zu prüfen. Im nachstehenden soll über die Ergebnisse dieser Untersuchung, die zunächst den Nachweis geringster Wismutspuren im Harn zum Gegenstand haben, berichtet werden.

Zunächst richteten wir unser Augenmerk darauf, die zeit- und materialraubende Veraschung des Harns zu umgehen. Es war naheliegend, den von FAIRHALL<sup>7)</sup> für den Nachweis des Bleies eingeschlagenen Weg auch für den Nachweis des Wismuts zu versuchen, dies um so mehr, als die Fällung des Wismuts als Phosphat eine in der analytischen Chemie gangbare quantitative Methode darstellt. Vorversuche an Harnen, denen wir größere Mengen von Wismutnitrat zusetzten und in denen durch Zusatz von Ammoniak die Ausfällung der Erdalkaliphosphate bewirkt wurde, ergaben nun, daß es gelingt, auf diese Weise das Wismut quantitativ in den Phosphatniederschlag überzuführen. Nach diesen Vorversuchen lag der einzuschlagende Weg klar vor uns. Im folgenden soll die Methode beschrieben werden, die sich uns nach einer Reihe von Versuchen als absolut einwandfrei und sicher erwiesen hat.

Von den auf Wismut zu prüfenden Harnen werden 100 ccm mit drei Tropfen einer 3%igen Lösung von Bleiazetat und mit Ammoniak bis zur stark ammoniakalischen Reaktion versetzt. Nach kurzem Stehen zentrifugiert man den Phosphatniederschlag

<sup>5)</sup> H. MÜLLER und KÜRTHY, Biochem. Zeitschr. 147, 377—84, 1924, *ibid.* 385—89, *ibid.* 149, 235—38 und 239—44, 1924.

<sup>6)</sup> F. FEIGL, B. 62, 1140, 1929.

<sup>7)</sup> FAIRHALL, Journ. of biol. Chem. 60, 481, 1924.

ab, die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, der Niederschlag in wenig konzentrierter Salpetersäure aufgenommen und in einer Quarzschale verascht. Die Veraschung erfordert bei den geringen Mengen organischer Substanz, die vom Niederschlag eingeschlossen werden, nur wenige Minuten. Die reinweiße Asche wird in der eben notwendigen Menge konzentrierter Salzsäure gelöst, die geringen Bleimengen lösen sich hierbei anstandslos. Nach entsprechender Verdünnung mit destilliertem Wasser prüft man einen Teil (zirka 5 ccm) der Lösung mit der jedesmal frisch zu bereitlebenden alkalischen Stannitlösung, wie sie von FEIGL angegeben wird (gleiche Mengen 25%iger Natronlauge und einer Lösung, die 5 g Stannochlorid in 5 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst auf 90 ccm Wasser enthält). Die auf Zusatz der alkalischen Stannitlösung ausfallenden Erdalkaliphosphate stören die Reaktion in keiner Weise, im Gegenteil, es wird durch den Phosphatniederschlag die Beurteilung wesentlich erleichtert, indem offenbar das bei der Reduktion des Wismuthydroxyds durch Stannit gebildete Wismut an die Oberfläche der Phosphate adsorbiert wird und so besonders wirksame Kristallisationskeime für das Blei geschaffen werden. Während bei größeren Wismutmengen der Phosphatniederschlag sich augenblicklich tief schwarz färbt, sieht man bei den minimalsten Mengen, besonders bei auffallendem Licht gegen weißen Hintergrund, zunächst auf einzelnen der Phosphatflocken schwarze Pünktchen auftauchen, bis dann allmählich der ganze Niederschlag, je nach der Menge des vorhandenen Wismuts, sich bräunlich bis braunschwarz verfärbt. Störungen durch die im normalen Harn enthaltenen geringen Mengen von Eisen, bezw. Kupfer sind, wie wiederholt ausgeführte Kontrolluntersuchungen an normalen Harnen zeigten, nicht zu befürchten. Die enorme Empfindlichkeit der Reaktion zeigt nachfolgende Untersuchungsreihe, welche mit Zusatz von bekannten Wismutmengen zu normalem Harn durchgeführt wurden. Als Zusatz wurde eine Wismutnitratlösung verwendet, deren Gehalt an metallischem Wismut, gravimetrisch kontrolliert, 1 mg Bi pro ccm entsprach und von der in exakten Meßkolben mit geeichten Pipetten die entsprechenden Verdünnungen hergestellt wurden.

100 ccm Harn + 1 ccm der Wismutstammllösung = 1 mg Bi; Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt, davon 5 ccm, entsprechend 0,05 mg Wismut, verwendet. Augenblickliche Schwarzfärbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der zehnfach verdünnten Wismutstamm-  
lösung = 0,1 mg Bi. Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt, davon  
zur Reaktion 5 ccm, entsprechend 0,005 mg Bi. Augenblickliche  
Schwarzfärbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der hundertfach verdünnten Wismut-  
stammlösung = 0,01 mg Bi. Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt,  
davon 5 ccm = 0,0005 mg Bi untersucht. Nach wenigen Sekunden  
Braunfärbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der Wismutstammlösung 1 : 1000 =

Name und Nummer des Patienten	Injizierte Menge Bismogenol	Tage seit der letzten Injektion	Verwendete Mengen Harn in ccm	Ausfall der Reaktion
B. I.	$\frac{1}{2}$	2	10	nach 1 Minute Schwarzfärbung
Fr. II.	$2\frac{1}{2}$	2	10	Nach 30 Sekunden Schwarzfärbung
T. III.	$2\frac{1}{2}$	0	5	Momentane Schwarzfärbung
P. IV.	$3\frac{1}{2}$	2	5	Nach 10 Sekunden Schwarzfärbung
F. V.	$3\frac{1}{2}$	3	10	Nach 30 Sekunden Schwarzfärbung
A. VI.	$4\frac{1}{2}$	2	5	Nach 10 Sekunden Schwarzfärbung
F. VII.	5	3	5	Nach 5 Minuten Braunfärbung
Br. VIII.	5	3	5	Nach 5 Sekunden Schwarzfärbung
Ho. IX.	$5\frac{1}{2}$	0	2	Nach 5 Minuten deutliche Braun- färbung
N. X.	$7\frac{1}{2}$	0	10	Momentane Schwarzfärbung
G. XI.	$7\frac{1}{2}$	0	2	Momentane Schwarzfärbung
W. XII.	$7\frac{1}{2}$	2	10	Momentane Schwarzfärbung
Hu. XIII.	$7\frac{1}{2}$	0	1	Momentane Braunfärbung Nach 1 Minute Schwarzfärbung

0,001 mg Bi. Ausführung wie oben. 5 ccm der Aschenlösung entsprechen 0,00005 mg Bi. Nach zwei Minuten deutliche Verfärbung einzelner Flocken, nach weiteren drei bis vier Minuten der ganze Niederschlag deutlich bräunlich gefärbt. Empfindlichkeit 1 : 20,000.000.

Es zeigt sich also, daß selbst bei der minimalen Menge von 1  $\gamma$  Bi in 100 ccm Harn der Nachweis des Wismuts einwandfrei zu führen ist. Auch bei der Untersuchung des Harns von mit Wismut behandelten Patienten ergibt die Methode einwandfreie Resultate. Durch das Entgegenkommen der Klinik ARZT\*) waren wir in der Lage, eine größere Reihe von Harnen von Patienten, die mit Bismogenol behandelt worden waren, zu untersuchen. Die vorstehende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Resultate und zeigt gleichzeitig die Leistungsfähigkeit der Methode.

Wie ersichtlich, läßt sich selbst in so minimalen Mengen wie 1 ccm Harn das Wismut einwandfrei nachweisen. Weitere Untersuchungen haben uns gezeigt, daß die Veraschung des Phosphatniederschlages nicht unbedingt nötig ist, sondern, daß die Reaktion auch nach Auswaschen und Lösen des Niederschlages in wenigen Tropfen konzentrierter Salzsäure durchführbar ist. Hier wäre freilich zu bedenken, daß eventuell die Gegenwart von Quecksilber den Wismutnachweis fälschen könnte. Wenn uns auch Kontrolluntersuchungen, die wir an mit größeren Mengen Sublimat versetzten Harnen durchführten, keinen Anhaltspunkt dafür ergaben, daß das Quecksilber mit in den Phosphatniederschlag eingeht, möchten wir doch raten, in den Fällen, in denen Wismut neben Quecksilber nachzuweisen ist, von der Veraschung Gebrauch zu machen.

Gegenüber den bisher üblichen Methoden des Wismutnachweises scheint uns die Anwendung der von FEIGL empfohlenen induzierten Reaktion in der hier angegebenen Weise wesentliche Vorteile zu besitzen. Sie erspart die Veraschung größerer Mengen von Harn, ist absolut spezifisch — auch Arsen und Antimon stören nicht — und übertrifft die bisher geübten Nachweismethoden um ein Vielfaches an Empfindlichkeit. Ihr weiterer Vorteil ist die Raschheit des Nachweises, der sich innerhalb von 15 Minuten mit Leichtigkeit erbringen läßt.

\*) Herrn Assistent Dr. MATRAS möchten wir auch an dieser Stelle für die Überlassung des Materials unseren besten Dank aussprechen.