

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der Universität Genf
[Prof. *Amé Pictet.*])

Beitrag zur Bestimmung von Kupfer in Organen.

Von

Emile Cherbuliez und Stefan Ansbacher.

(Eingegangen am 20. März 1930.)

Die Arbeit von *Hans Kleinmann* und *Joachim Klinké* „Über den Kupfergehalt menschlicher Organe“¹ regt uns an, unsere Erfahrungen in der Methodik der Kupferbestimmung in tierischen und menschlichen Organen hier kurz zusammenfassend mitzuteilen, um sie dadurch den Pathologen und Physiologen zugänglicher zu machen, als dies durch unsere bisherigen Veröffentlichungen in nicht medizinischen Zeitschriften geschehen sein mag^{2, 3, 4}.

Beim Ausarbeiten der im folgenden beschriebenen Methode wurde Wert darauf gelegt, einen möglichst einfachen Arbeitsgang zu finden, der es erlaubt, mit möglichst einfachen Hilfsmitteln Kupfermengen bis zu $1 \gamma = 0,001 \text{ mg}$ mit einer Genauigkeit von mindestens $\frac{1}{2} \gamma$ zu bestimmen. Wir glauben, das gestellte Ziel erreicht zu haben, indem wir ein einfaches und schnelles Verfahren zum Zerstören der organischen Substanz, Fällens des Kupfers als Sulfid und volumetrischen Bestimmen des Kupfers, nach Auflösen in Salpetersäure, gefunden haben.

Der Vorteil unseres Arbeitsganges gegenüber den bisher angewandten Methoden zum Bestimmen des Kupfers in Organen scheint uns darin zu liegen, daß die einzelnen Maßnahmen rasch auszuführen sind oder ohne Aufsicht verlaufen, daß nur eine einzige Filtration vorgenommen wird (und diese unter Vermeiden von Papierfilter), daß das Überführen der Lösungen aus einem Gefäß in ein anderes im ganzen Verlauf nur zweimal stattfindet und daß keinerlei besondere Apparatur in Frage kommt.

Reagentien.

1. Schwefelsäure konzentriert p. a. kupferfrei
2. Überchlorsäure 20%₀. kupferfrei

3. Salpetersäure rauchend konzentriert p. a. kupferfrei
4. Aqua destillata kupferfrei
Gewöhnliches Leitungswasser, einmal aus Glasgefäßen destilliert, genügt den Anforderungen; zum Herstellen eines praktisch kupferfreien Wassers durch Destillation ist gewöhnliches Leitungswasser dem „destillierten Wasser“ vorzuziehen, da dieses gewöhnlich aus Kupfergefäßen destilliert wird und daher kupferreicher ist.
5. Ammoniak konzentriert kupferfrei
6. Lösung von nitroso-chromotropsaurem Natrium zur Kupfertitration (im folgenden Titrierlösung genannt).
7. Kupfer-Standardlösung. 0,1964 g reines Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) werden in Aqua destillata (nach 4. destilliert) zum Liter gelöst. Diese Lösung enthält pro Kubikzentimeter $50 \gamma = 0,05 \text{ mg Cu}$.

Apparate.

Außer der gewöhnlichen chemischen Apparatur (Kjeldahl- und Erlenmeyerkolben, Schwefelwasserstoffgasentwickler, Büretten usw.) nur Filtriertiegel aus Porzellan (von der Berliner Staatlichen Porzellanmanufaktur) mit porösem Boden.

Vorbereiten der Reagentien.

Das Herstellen oder Beschaffen der Reagenzien (die Produkte der Firma *E. Merck, Darmstadt*, haben auch ¹ uns vollständig befriedigt) bedarf keiner näheren Erläuterung mit Ausnahme des Bereitens der Titrierlösung. Die Kupferbestimmung beruht auf der Fähigkeit des Kupfer (II)-ions, mit gewissen Farbstoffen, namentlich o-Nitroso-oxyderivaten, Lacke von starker und vom freien Farbstoff verschiedener Farben zu bilden, so z. B. mit der 1,8-Dioxy-2-nitroso-3,6-naphthalindisulfonsäure (Nitroso-chromotropsäure) ⁵.

a) Herstellen der Titrierlösung.

Am zweckmäßigsten bereitet man die Lösung des Natriumsalzes der Nitroso-chromotropsäure nach folgenden Angaben: Man löst 0,37 g chromotropsaures Natrium (Handelssalz *Kahlbaum*) in wenig Wasser. Dieser Lösung setzt man 1 ccm 2-n-Natriumcarbonatlösung (212 g Na_2CO_3 im Liter), 0,5—0,6 ccm 2-n-Natriumnitritlösung (138 g NaNO_2 im Liter) und verdünnte Essigsäure im Überschuß zu. Nach 24 Stunden filtriert man und macht die Lösung durch Zugabe von Natriumcarbonat schwach alkalisch. Man verdünnt mit Wasser auf 100 ccm, nimmt 34 ccm dieser Lösung und verdünnt auf einen Liter durch Zugabe von Wasser und etwa 50 ccm Alkohol. So erhält man einen Liter Titrierlösung, die haltbar ist. Sie ist braun gefärbt. Mit Kupfer (II)-ion bildet sie in schwach ammoniakalischer Lösung ein permanganat-farbiges

Komplexsalz. Ein Kubikzentimeter der Titrierlösung entspricht ungefähr 10 γ Kupfer. Ihr genauer Wirkungswert ist mittels der Kupfer-Standardlösung jeweils festzustellen.

b) Titerstellen der Titrierlösung.

Zum Bestimmen des Wirkungsgrades der Titrierlösung pipettiert man einen Kubikzentimeter der Kupfer-Standardlösung in ein Reagensglas, verdünnt mit Aqua destillata auf ungefähr 5 ccm und gibt 3 Tropfen konzentrierten Ammoniak zu. Dann läßt man aus einer Bürette unter Umschwenken des Reagensglases tropfenweise die Titrierlösung zufließen. Die ersten Tropfen rufen die schon erwähnte Permanganatfarbe hervor. Wenn alles Kupfer (II)-ion verbraucht ist, schlägt diese Farbe in braunrot um. Um diesen Endpunkt genau zu erkennen, ist es zweckmäßig, bei gutem Tageslicht zu arbeiten und im Anfang, wenn das Auge noch nicht für den Farbumschlag geschult ist, zwei Vergleichslösungen neben die zu titrierende Lösung zu halten, deren eine den Endpunkt noch nicht erreicht und deren andere ihn schon überschritten hat. Es ist selbstverständlich, daß man kurz vor dem Endpunkt nur noch Bruchteile eines Tropfens zugeben darf, damit ein Höchstmaß von Genauigkeit erreicht wird. Die Berechnung des Ergebnisses ist sehr einfach: Wenn 1 ccm Kupfer-Standardlösung (= 50 γ Cu) z. B. 4,95 ccm Titrierlösung verbraucht, so entspricht 1 ccm der Titrierlösung $\frac{50}{4,95} = 10,1 \gamma$ Cu.

Gang der Analyse.

a) Zerstören der organischen Substanz².

Die abgewogene zu untersuchende Substanz wird im Kjeldahlkolben mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure übergossen und mit 10 ccm Überchlorsäure (20%) und 1 ccm rauchender konzentrierter Salpetersäure versetzt. Man erhitzt dieses Gemisch über einer ganz kleinen Flamme (ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde lang), dann engt man es durch stärkeres Erhitzen ein, bis weiße Dämpfe auftreten, und läßt erkalten. Sollte das Reaktionsprodukt nicht ganz farblos geworden sein, so setzt man nach Erkalten nochmals Überchlorsäure und Salpetersäure in den angegebenen Mengen zu und erhitzt wie bei der ersten Zugabe dieser Säuren. Durch wiederholte Zugaben von Überchlorsäure und Salpetersäure kann man auch größere Mengen organischer Substanz (bis zu etwa 25 g) unter Anwenden der geringen angegebenen Schwefelsäuremenge zerstören; das Endvolumen ist noch kleiner als das der ursprünglich verwandten Schwefelsäure, da auch diese zum Teil bei der Oxydation verbraucht wird. Es ist zu beachten, daß die Wirkung der Überchlorsäure und Salpetersäure nur bei genügender Schwefelsäurekonzentration eintritt;

der Zusatz jener Säuren soll deshalb die Hälfte des Volumens der angewandten Schwefelsäure nicht überschreiten. Es ist selbstverständlich, daß man Schwefelsäure zusetzen muß, wenn das Volumen zu klein wurde, bevor das Zerstören der Substanz vollkommen stattgefunden hat. Falls es sich um sehr kleine Mengen handelt, so kann man sich von vorne herein natürlich mit kleineren Säuremengen begnügen (z. B. für die Milz eines neugeborenen Meerschweinchens, rund 0,1 g, mit 2—3 ccm Schwefelsäure und den entsprechend kleineren Mengen von Überchlorsäure und Salpetersäure). Flüssigkeiten (Blut, Harn, Milch usw.) werden im Kjeldahlkolben mit einer angemessenen Menge Schwefelsäure versetzt und bis zur Entwicklung weißer Dämpfe eingengt, bevor man mit dem Zusatz von Überchlorsäure und Salpetersäure beginnt. Das Zerstören organischer Substanzen verläuft ohne Aufsicht und auffallend schnell.

b) Fälln des Kupfers als Sulfid.

Die schwefelsaure Lösung wird vorsichtig mit Wasser verdünnt und quantitativ in einen Erlenmeyerkolben gebracht, wobei man mit soviel Wasser nachspült, daß die Endkonzentration an Schwefelsäure 5—15 Volumprozent beträgt. Ohne Rücksicht auf den evt. auftretenden Niederschlag (unlösliche Sulfate, Kieselsäure) erhitzt man nun kurz zum Sieden. Dann leitet man Schwefelwasserstoffgas ein, bis vollkommenes Erkalten eingetreten ist. Das gebildete Kupfersulfid bleibt manchmal in kolloidaler Lösung, es kann aus dieser Lösung niedergeschlagen werden durch Oxydation von etwas Schwefelwasserstoff zu Schwefel, der beim Ausfallen alles Sulfid mitreißt. Da die schwefelsaure Lösung noch Salpetersäure enthält, wird immer eine genügende Menge Schwefelwasserstoff zu Schwefel oxydiert, so daß die Sulfide sich immer glatt filtrieren lassen; eine Zugabe von Brom, wie *Schönheimer* und *Oshima*⁶ und *Kleinmann* und *Klinke*¹ vorschlagen, ist nach unserem Gang nicht nötig. Man filtriert durch einen Filtertiegel mit porösem Boden und wäscht mit schwach essigsaurem, schwefelwasserstoffhaltigem Wasser quantitativ aus.

c) Lösen des Kupfersulfids.

Nach dem Auswaschen stellt man den Tiegel sogleich in ein Glasdreieck, das man auf eine kleine Krystallisierschale legt, die auf dem Wasserbade steht. Man gibt etwas rauchende konzentrierte Salpetersäure, die das Kupfersulfid sofort löst, in den Tiegel. Die Lösung tropft durch den porösen Boden direkt in das Schälchen und wird hier sogleich eingedampft. Durch wiederholte Wasserzugabe in den Tiegel wird das Kupfer quantitativ in das Schälchen übergeführt, das solange auf dem Wasserbade verbleiben muß, bis alle Flüssigkeit vollkommen verdampft ist.

d) Kupfertitration.

Man nimmt den Rückstand im Krystallisierschälchen in Wasser auf und verdünnt auf ein bekanntes Volumen. Von dieser Lösung pipettiert man so viel in ein Reagensglas, als ungefähr 50 γ Kupfer entsprechen. Bei einiger Übung läßt sich aus der Farbe des Schwefelwasserstoffniederschlags abschätzen, auf welches Volumen man ungefähr verdünnen muß, um nicht mehr als 10 ccm in das Reagensglas pipettieren zu müssen. Die Titration selbst geschieht so wie das Titerstellen der Titrierlösung. Die vorhandene Kupfermenge errechnet sich demnach in γ durch Multiplizieren der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter der Titrierlösung mit der bei dem Titerstellen gefundenen Zahl (im angenommenen Beispiel also mit 10,1).

Prüfung der Methode.

Wir haben an anderer Stelle ⁴ ausführlichst über die Genauigkeit unserer Methode berichtet. Bei Kupfermengen von 100—1 γ ergab sich ein Höchstfehler von weniger als 0,5 γ . Besondere Versuche haben ferner gezeigt, daß die Gegenwart anderer Metalle, deren Sulfide mit dem Kupfersulfid in saurer Lösung gefällt werden, nicht störend einwirken.

Einige Ergebnisse.

Unsere Kupferbestimmungen erstrecken sich auf Tier und Mensch. Die dabei gefundenen Werte decken sich, soweit unsere mit frischem Organ gemachten Bestimmungen einen Vergleich mit an Trockenrückstand erhaltenen Zahlen zulassen, mit denen von *Kleinmann* und *Klinke* ¹ und auch mit den neuesten des pathologischen Institutes der Universität Freiburg i. B., wie uns *R. Schönheimer* persönlich mitteilte. Die Beobachtung des erhöhten Kupfergehaltes der Leber menschlicher Neugeborener haben wir schon im August 1929 ⁷ mitgeteilt ⁸, eine Beobachtung die von *Lubarsch* ⁹ und *Kleinmann* und *Klinke* ^{1*} bestätigt wurde. Unsere Werte den Kupfergehalt der Organe gesunder und tuberkulöser Meerschweinchen betreffend stehen an anderer Stelle ³. Sie zeigen, daß beim Meerschweinchen der Kupfergehalt der Neugeborenen nicht nur in der Leber, sondern in noch verstärktem Maße in der Milz bedeutend höher als bei dem ausgewachsenen Tiere ist. Hier seien nur

* Anmerkung des Herausgebers: Um eine „Bestätigung“ in dem Sinne, daß eine bereits bekannt gemachte Beobachtung nachgeprüft und „bestätigt“ wurde, handelt es sich nicht. Die Untersuchungen *Kleinmanns* und *Klinkes* waren bereits im Juli 1929 abgeschlossen; die Arbeit wurde am 20. 9. 29 an die Schriftleitung von Virchows Archiv eingereicht. Da sie für die zu meinem 70. Geburtstag erscheinende Festschrift bestimmt war, konnte sie nicht vor Januar 1930 erscheinen und es hätte wohl auch den Verfassern als selbstverständlich erscheinen müssen, daß eine in der Schweiz auf einer Tagung gemachte mündliche Mitteilung noch nicht kurze Zeit danach in Berlin bekannt sein und zu Nachprüfungen Anlaß geben konnte. *Kleinmanns Arbeit ist völlig unabhängig* von der vorstehenden.

unsere in jüngster Zeit gemachten Kupferbestimmungen an menschlichen cirrhotischen und nicht cirrhotischen Lebern wiedergegeben, die auf Anregung von Professor *M. Askanazy* (pathologisches Institut der Universität Genf) ausgeführt worden sind. Aus ihnen geht wiederum hervor, daß sich die vor vielen Jahren aufgestellte Annahme *Askanazys*¹⁰ bestätigt: die gesteigerte Kupferzufuhr zur Leber ist bei der Entwicklung der Lebercirrhose zu berücksichtigen.

Der Kupfergehalt der Leber ist bei Lebercirrhose oftmals erhöht. Folgende Tabelle diene als Stütze für die Schlüsse des Pathologen:

Alter Jahre	Ge- schlecht	Sektionsbefund	Gewicht der Leber g	Kupfer pro kg Frisch- organ mg
Nicht cirrhotische Lebern.				
74	♀	Carcinom der Portio	1200	0,6
50		Bronchopneumonie, Alkoholiker	1600	3,0
20		Bronchopneumonie	2030	3,0
65		Bronchopneumonie	2400	3,2
52		Aortensyphilis, Herzdilatation	1700	6,0
23		Myeloblastenleukämie	3040	6,4
64		Lymphatische Leukämie, Pneumonie	1720	7,5
51		Akute myeloische Leukämie	2300	9,3
48		Unfalltod, Fettleber	1870	9,9
Cirrhotische Lebern.				
53	♀	Laënnecsche Cirrhose, Carcinommetastasen	1140	2,9
61		Laënnecsche Cirrhose, Blutungen der Speise- röhre	1750	3,0
67		Cirrhotische Fettleber, Bronchopneumonie	1080	3,1
69		Lebercirrhose, Diabetes	1720	3,2
46		Laënnecsche Cirrhose, aplastische Anämie	2420	9,3
65		Laënnecsche Cirrhose, Syphilis	980	12,7
53		Lebercirrhose, Bronchopneumonie	1650	14,7
58		Cirrhotische Fettleber, ulceröse Aortenendo- carditis, Alkoholiker	1980	16,3
65		Laënnecsche Cirrhose, Pneumonie	1970	22,5
64		Laënnecsche Cirrhose, Bronchopneumonie	1240	22,7
50		Laënnecsche Cirrhose, Unfalltod	2300	29,5
59		Lebercirrhose, Bronchopneumonie	2600	45,0
62		Laënnecsche Cirrhose, Bronchopneumonie	1120	85,6

Zum Schluß eine kleine Anregung die Kupferbestimmung betreffend, die zum Studium der Lebercirrhose in das Programm der internationalen Gesellschaft für vergleichende Völkerpathologie aufgenommen ist: Um möglichst viele vergleichbare Zahlen zu erhalten, sollte man neben dem Kupfergehalt auch noch die Trockensubstanz (z. B. Gewichtskonstanz bei 110° C) bestimmen und einheitlich den Kupfergehalt der Frischsubstanz, der am schnellsten bestimmbar ist, zum Mindestfordernis der Kupferbestimmung machen.

Schrifttum.

¹ Kleinmann u. Klinke: Virchows Arch. **275**, 422 (1930). — ² Cherbuliez: Helvet. chim. Acta **12**, 818 (1929). — ³ Cherbuliez et Ansbacher: Archives Genève [5], **11**, Suppl., 144 (1929). — ⁴ Cherbuliez et Ansbacher: Helvet. chim. Acta **13**, 187 (1930). — ⁵ Brenner: Helvet. chim. Acta **3**, 90 (1920). — ⁶ Schönheimer u. Oshima: Hoppe-Seylers Z. **180**, 249 (1929). — ⁷ Cherbuliez: Actes de la Soc. Helvet. des Sc. Natur. Davos **1929 II**, 10, 141. — ⁸ Andrianoff u. Ansbacher: Dtsch. med. Wschr. **1930**, Nr 9. — ⁹ Lubarsch: Dtsch. med. Wschr. **1929**, Nr 42. — ¹⁰ Askanazy: Verh. dtsch. path. Ges. Wien **1929**, 87.
