

(*Physiologisch Laboratorium der Universiteit van Amsterdam*).

## HET BEPALEN VAN SULFATEN IN URINE,

DOOR

A. L. FLOHR, *zden assistent voor de chemische physiologie.*

De sulfaten komen in de urine in twee vormen voor. Ten eerste de z. g. anorganische sulfaten; d. z. sulfaten, die geïoniseerd zijn in  $\text{SO}_4$ -ionen en die dan ook met  $\text{Ba Cl}_2$  onmiddellijk een neerslag geven. Ten tweede esterachtig gebonden sulfaten, die eerst na hydrolyse met  $\text{HCl}$   $\text{SO}_4$ -ionen vormen en dan pas neer te slaan zijn met  $\text{Ba Cl}_2$ . Deze laatste waren ontdekt door BAUMANN.

Ter bepaling dezer twee vormen van sulfaten zijn in den loop van den tijd verscheidene methoden voorgesteld. Langen tijd gold die van BAUMANN als de eenige goede. Wij zullen zien, dat deze sulfaatbepaling niet zoo eenvoudig is, als BAUMANN het zich heeft voorgesteld. Zijn methode <sup>1)</sup> luidt als volgt:

Vijftig  $\text{cm}^3$  urine, verdund met een even groote hoeveelheid water, wordt aangezuurd met azijnzuur en daarna bedeed met  $\text{Ba Cl}_2$ -oplossing in overmaat. Dit mengsel wordt nu een tijdje (ongeveer  $\frac{3}{4}$  uur) op het waterbad verwarmd, totdat het neerslag geheel is bezonken. Daarna decanteert men de bovenstaande vloeistof en filtreert de rest. Men wast het neerslag uit met warm azijnzuurhoudend water, droogt het filter plus het neerslag, verascht in een porceleinen kroes, rookt daarna het residu af met een paar druppels geconcentreerd  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en weegt het  $\text{Ba SO}_4$ . Hieruit is het gehalte aan anorganische sulfaten te berekenen.

Filtraat plus waschwater dampt men in, voegt voor elke 100  $\text{cm}^3$  vloeistof 10  $\text{cm}^3$   $\text{HCl}$  toe en kookt. Hierdoor worden de zwavelzure esters gehydrolyseerd en door de overmaat  $\text{Ba Cl}_2$  onmiddellijk daarna als  $\text{Ba SO}_4$  neergeslagen. Om te zien, of er genoeg  $\text{Ba Cl}_2$  was toegevoegd, voegt men daarna nog eenige druppels van dit reagens toe; er mag dan geen nieuwe troebeling optreden. Na het koken wordt de vloeistof nog eenige uren op het waterbad verwarmd, daarna voorzichtig gedecanteerd en de rest gefiltreerd. Men wast het neerslag uit met heet water, totdat het filtraat geen chloor-reactie meer geeft, behandelt het residu met heeten alcohol en daarna met aether om harsachtige stoffen te verwijderen, droogt, enz..

BAUMANN's methode berust dus hierop, dat de zwavelzure esters niet ontleed worden door warm verdund azijnzuur. Dat dit wel het geval is, leeren ons de onderzoeken van FOLIN. In een uitvoerige studie betoogt FOLIN <sup>2)</sup>, dat zijn hieronder beschreven methode in tegenstelling met die van BAUMANN zeer betrouwbare uitkomsten oplevert.

<sup>1)</sup> NEUBERG, *Der Harn*. Bestimmung der Sulfatschwefelsäure und der gepaarten Schwefelsäure nebeneinander nach E. BAUMANN.

<sup>2)</sup> *The Journal of biological chemistry*, 1906, bldz. 131.

Men mengt in een ERLEMEYER-kolf van ongeveer 250 cM<sup>3</sup> inhoud 25 cM<sup>3</sup> urine, 100 cM<sup>3</sup> water en 10 cM<sup>3</sup> verdund HCl (1 vol. geconc. HCl s. g. 1.2 met 4 vol. H<sub>2</sub>O). Bij verdunde urine neemt men de verhouding 50 cM<sup>3</sup> urine en 75 cM<sup>3</sup> water. Hierbij voegt men druppelsgewijs toe 10 cM<sup>3</sup> Ba Cl<sub>2</sub>-oplossing (5 pCt.) zonder in de vloeistof te roeren of de kolf om te zwenken. Dit laat men nu rustig staan gedurende minstens één uur, zwenkt dan de kolf om en filtreert den inhoud door een GOOCH-kroesje. Men wast het neerslag uit met 250 cM<sup>3</sup> koud water, droogt en verhit. Uit het gewicht van het Ba SO<sub>4</sub> is het gehalte aan anorganische sulfaten te berekenen.

In een tweede hoeveelheid urine bepaalt men de totaalsulfaten (anorganische + esterachtige) op deze manier:

Meng 25 cM<sup>3</sup> urine met 20 cM<sup>3</sup> verdund HCl (1 vol. geconc. HCl + 4 vol. H<sub>2</sub>O), kook zacht gedurende 20—30 minuten. Koel af en verdun met water tot 150 cM<sup>3</sup>. Voeg nu druppelsgewijs toe zonder omroeren of schudden 10 cM<sup>3</sup> BaCl<sub>2</sub>-oplossing (5 pCt.) en behandel het verder op dezelfde manier als bij de anorganische sulfaten is aangegeven.

FOLIN's proeven herhalende, kreeg ik bij vergelijking van zijn methode met die van BAUMANN de volgende uitkomsten:

Mgr. SO<sub>3</sub> per 25 cM<sup>3</sup> urine.

METHODE BAUMANN.			METHODE FOLIN.		
Anorganisch.	Esterachtig.	Totaal.	Anorganisch.	Esterachtig.	Totaal.
Urine 1 } a 43.1	2.3	45.4	Urine 1 } a 40	5.5	45.5
} b 44	1.8	45.8	} b 40.1	5.3	45.4
Urine 2 } a 45.8	6.5	52.3	Urine 2 } a 38.8	13.4	52.2
} b 44.1	8.9	53.0	} b 38.6	13.5	52.1

Uit deze tabel zien wij, dat BAUMANN's methode steeds hooge (en geen kloppende) uitkomsten geeft voor de anorganische sulfaten. Dit is te verklaren, dat azijnzuur in de warmte op den duur de zwavelzure esters ontleedt. Gemakkelijk ontleedbaar is bijv. indoxyl- en skatoxylzwavelzuur<sup>1)</sup>. Daarentegen werkt verdund zoutzuur in de koude blijkens de uitkomsten van FOLIN niet hydrolyseerend, althans binnen een paar uur.

Een nadeel dezer gravimetrische methode van FOLIN is, dat zij veel tijd in beslag neemt. Minder tijdroovend en toch even betrouwbaar als de methode van FOLIN is de volumetrische van ROSENHEIM en DRUMMOND<sup>2)</sup>. Zij berust op de geringe oplosbaarheid van benzidinesulfaat. Benzidine, van de formule NH<sub>2</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> NH<sub>2</sub> is een zwakke base. De benzidinezouten van sterke zuren zijn in waterige oplossingen gemakkelijk dissocieerbaar. Hierdoor hebben wij een middel aan de hand om in het neerslag titrimetrisch het

1) C. ADRIAN, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* 1894, bldz. 134.  
*The biochemical journal* 1914 en 1915.

$H_2SO_4$  te bepalen met NaOH. De oorspronkelijke methode van ROSENHEIM en DRUMMOND is de volgende:

Bereiding van het reagens: vier gr. benzidine (KAHLBAUM) wordt in een mortier met 10  $cm^3$  water tot een papje gewreven, dat met ongeveer 500  $cm^3$  water in een ruime kolf van 2 L. wordt gespoeld. Nu voegt men 5  $cm^3$  geconcentreerd HCl (S.G. 1.19) toe en schudt, totdat het zout geheel is opgelost. Daarna verdunt men met water tot 2 L.; 150  $cm^3$  dezer oplossing is voldoende om 100 mgr.  $H_2SO_4$  neer te slaan.

Uitvoering der titratie. Bepaling der anorganische sulfaten: Doe 25  $cm^3$  urine in een ERLEMEYER-kolf van ongeveer 250  $cm^3$  inhoud; zuur de urine aan met verdund HCl (1:4) tot zure reactie ten opzichte van congopapier, waarvoor ongeveer 2  $cm^3$  zuur wordt vereischt. Hieraan wordt toegevoegd 100  $cm^3$  van de benzidineoplossing. Na 10 minuten staan filtreert men de vloeistof door een zuigfilter<sup>1)</sup>. Men wast kolf en filter uit met 10—20  $cm^3$  verzadigde benzidinesulfaatoplossing. Het neerslag plus het filter worden in dezelfde ERLEMEYER-kolf teruggebracht en de nog achtergebleven kristalletjes in den trechter zorgvuldig in de kolf gespoten. Het benodigde water bedraagt ongeveer 50  $cm^3$ . Eindelijk wordt warm getitreerd met 0.1 n KOH (phenolphthaleïne als indicator). Zijn de kristallen van benzidinesulfaat door te hard zuigen tot grootere stukken samengepakt, dan is het noodig met een bekende hoeveelheid 0.1 n KOH te koken, totdat de kristallen geheel in oplossing zijn gegaan, en wordt de overmaat KOH teruggetitreerd met 0.1 n  $H_2SO_4$ .

Bepaling der totaalsulfaten: meng samen 25  $cm^3$  urine, 20  $cm^3$  water en 2—2.5  $cm^3$  HCl (1:4). Kook zacht gedurende 15—20 minuten, liefst op een zandbad met een terugvloeikoeler op de kookkolf. Na deze hydrolyse voegt men de benzidineoplossing toe en handelt overigens precies als beschreven staat bij de anorganische sulfaatbepaling.

Aan eenvoudigheid laat deze methode dus niets te wenschen over<sup>2)</sup>. Wil de methode betrouwbaar zijn, dan moet zij aan drie voorwaarden voldoen, t. w.:

1<sup>o</sup>. Bij de bepaling der anorganische sulfaten moeten alleen deze sulfaten neergeslagen worden. Het neerslag moet vrij zijn van de zwavelzure esters.

2<sup>o</sup>. In het neerslag mogen geen andere urinebestanddelen voorkomen.

3<sup>o</sup>. Het neerslaan der totaalsulfaten na de hydrolyse moet volledig zijn. Ter bevestiging dezer voorwaarden zijn door ROSENHEIM en DRUMMOND de volgende proeven genomen:

Voorwaarde 1: a. Synthetisch bereide zwavelzure esters worden niet neergeslagen in de koude, wel na korte hydrolyse met zoutzuur.

b. In de urine worden de anorganische sulfaten eerst neergeslagen met  $BaCl_2$ ; het filtraat geeft met benzidine geen neerslag.

1) Zeer goede diensten bewijst een glazen trechttertje met doorboorden platten bodem waarop een filter te maken van filtreerpapierpap.

2) Natuurlijk eischt deze methode, evenals de gravimetrische, zorgvuldige voorbereiding, zooals nauwkeurige stelling der titervloeistoffen, afwezigheid van  $CO_2$ , dat anders storend werkt bij gebruik van phenolphthaleïne als indicator, enz..

Voorwaarde 2: Bij voldoende aanzuring (zuur ten opzichte van congopapier) worden de fosphaten niet mede neergeslagen. Het kristallijne benzidineerslag blijkt bij kwalitatief onderzoek enkel sulfaten te bevatten.

Voorwaarde 3: Toegevoegde sulfaten worden weer kwantitatief neergeslagen. Het filtraat geeft met  $\text{BaCl}_2$  geen neerslag meer.

Eenige moeilijkheid levert de hydrolyse op, waarbij gewaakt moet worden, dat de vloeistof niet al te donker wordt, daar anders het benzidineerslag paars gekleurd wordt en het eindpunt der titratie (optreden van een rose kleur) dan moeilijk is waar te nemen. ROSENHEIM en DRUMMOND merken op, dat bij pathologische urine (in het bijzonder eiwithoudende) deze donkere kleur optreedt, niet-tegenstaande het gebruik van terugvloeikoeler en zandbad. Zij raden aan, de urine in dat geval eerst te onteiwitten.

Van de door mij bij de proeven gebruikte urine gaf er een, die sporen eiwit bevatte, inderdaad een donkere vloeistof. Een tweede urine was eiwitvrij, doch gaf, niettegenstaande bovengenoemde voorzorgsmaatregelen, toch een donkere verkleuring. Om het scherpe eindpunt der titratie te krijgen, is ontkleuring beslist noodzakelijk. Beenderenkool blijkt hiervoor uitstekend te voldoen. Echter moet de beenderenkool vooraf geprepareerd zijn, daar het handelsprodukt sulfaathoudend is. Bovendien zouden de fosphaten het zoutzuur kunnen afstoppen, waardoor in het benzidineerslag fosphaten kunnen voorkomen en dus de einduitkomst foutief wordt.

Kook hiertoe handelsbeenderenkool geruimen tijd met  $\text{HCl}$ , filtreer door een zuigfilter en wasch uit met heet water, totdat het filtraat geen  $\text{SO}_4$  en  $\text{Cl}$ -reactie meer geeft, en droog. Het aldus verkregen produkt blijkt nog voldoende kleurstofabsorberende eigenschappen te hebben; 150 mgr. hiervan is voldoende om de vloeistof genoegzaam te ontkleuren, dat de storende invloed geheel wordt opgeheven.

De vraag doet zich voor, of deze geprepareerde beenderenkool geen sulfaten vasthoudt. Om dit te beantwoorden heb ik de volgende proeven genomen: 25  $\text{cm}^3$  van een waterige oplossing, bevattende 48 mgr.  $\text{SO}_4$  (in den vorm van  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), wordt 5 minuten lang samengekookt met 150 mgr. geprepareerde beenderenkool. Na afkoeling wordt de vloeistof gefiltreerd en het filter met 20  $\text{cm}^3$  koud water uitgewasschen. In het filtraat wordt het sulfaatgehalte volgens de benzidinemethode bepaald.

In een even groote hoeveelheid van dezelfde  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -oplossing wordt eveneens volgens de benzidine-methode het sulfaatgehalte bepaald, echter zonder voorafgaande behandeling met beenderenkool.

De volgende cijfers geven aan het aantal  $\text{cm}^3$  0.1 normaal  $\text{Na OH}$  benodigd voor de titratie.

Met beenderenkool.

10.1

10.0

Zonder beenderenkool.

10.05

10.0

In een andere reeks proeven vergeleek ik de uitkomsten der totaal-sulfaten, bepaald volgens de benzidine-methode (met ontkleuring met geprepareerde beenderenkool) naast die, bepaald volgens de

methode van FOLIN. De cijfers geven aan mgr.  $H_2SO_4$  per 25  $cm^3$  urine.

ROSENHEIM en DRUMMOND.		FOLIN.
Urine 1	{ 44.8	43.9
	{ 44.6	44.5
Urine 2	{ 47.7	47.9
	{ 47.8	47.7

Summa summarum houd ik de benzidine-methode van ROSENHEIM en DRUMMOND voor een zeer handige en zuivere methode voor het bepalen der sulfaten in urine. Is bij de hydrolyse de urine donker gekleurd, hetzij door wat slordig werken, hetzij door de eigenschappen der urine zelf, dan moet, vóór de toevoeging van het benzidinereagens, een ontkleuring met geprepareerde beenderenkool voorafgaan.

Ten slotte laat ik hieronder nog eenige uitkomsten volgen der sulfaatbepaling volgens de methode van ROSENHEIM en DRUMMOND en die van FOLIN.

Mgr.  $H_2SO_4$  per 25  $cm^3$  urine.

ROSENHEIM EN DRUMMOND.			FOLIN.				
Anorganisch.	Esterachtig.	Totaal.	Anorganisch.	Esterachtig.	Totaal.		
Urine 1	a 35.9	8.9	44.8	Urine 1	a 35.6	8.3	43.9
	b 35.6	9.0	44.6		b 35.6	8.9	44.5
Urine 2	a 34.4	13.3	47.7	Urine 2	a 34.5	13.4	47.9
	b 34.8	13.0	47.8		b 34.3	13.4	47.7

## NOG EENS OVER SAMENGESTELDE GENEESMIDDELEN,

DOOR

Dr. D. H. WESTER, *apotheker te 's-Gravenhage.*

Dr. W. STORM VAN LEEUWEN oordeelt het blijkbaar wenschelijk, in het *Nederl. Tijdschrift v. Geneesk.* van 15 Sept. 1917, tot voorzichtigheid te manen met het gebruik van samengestelde geneesmiddelen, die door fabrieken als potentieerende produkten in den handel worden gebracht. Daarbij wordt kritiek uitgeoefend op mijn „*Terug tot samengestelde geneesmiddelen*”. Op dat feit heb ik niets tegen, integendeel het verheugt mij, dat ook mijn geschriftje tot een gedachtenwisseling over het verschijnsel der onderlinge versterking van geneesmiddelen heeft geleid. Toevallig was ik 15 Sept. in de gelegenheid met dr. STORM VAN LEEUWEN over zijn artikeltje te spreken en dit wederwoord geldt dus niet hem, maar de lezers van dit *Tijdschrift*, wien ik in enkele woorden wil uiteenzetten, dat en waarom ik ondanks de uiteenzetting van dr. STORM VAN LEEUWEN mijn vroegere uitspraak handhaaf.

<sup>10</sup> Dr. STORM VAN LEEUWEN zal bij de lezers van zijn artikel allicht den indruk vestigen, dat ik uitsluitend of in hoofdzaak op grond van het, vnl. door BÜRGI