

Aus dem Institut für Serologie und experimentelle Therapie (Direktor: Professor Dr. FR. JAHNEL) der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut) in München.

Zur Stickstoffbestimmung in der Cerebrospinalflüssigkeit.

Von

FRANZISKA PRUCKNER und ELIAS MANUELIDIS.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1950.)

Unter den Untersuchungsmethoden der Rückenmarksflüssigkeit (Liquor) spielt die Bestimmung des Stickstoffes eine vergleichsweise untergeordnete Rolle. Dies ist verwunderlich angesichts der Tatsache, daß es gerade die im Stoffwechsel eine hervorragende Rolle spielenden, stickstoffhaltigen Verbindungen, wie die Eiweißstoffe und Aminosäuren, Harnstoff und Ammonsalze sind, die man — allerdings in Summe und nicht differenziert — sowohl bei Bestimmungen des Gesamtstickstoffes (G. N.) als auch des Reststickstoffes (R. N.) erfaßt. Schuld daran ist in erster Linie die fehlende Beziehung sowohl von G. N. als R. N. zu bestimmten Krankheitsbildern, daneben aber auch die ziemlich umständliche und zeitraubende, bisher übliche KJELDAHLsche Bestimmungsmethode, die überdies bei geringen N-Mengen eine erhebliche Unsicherheit aufweist, denn selbst bei kleindimensionierten Apparaturen treten bei der Destillation leicht Verluste ein. Es stehen aber vom Liquor in der Regel nur kleinste Mengen zu dieser Untersuchung zur Verfügung. Letztere Schwierigkeit nun scheint uns beseitigt, wenn man zur N-Bestimmung sich der kürzlich von TH. LEIPERT¹ beschriebenen „Hypobromitmethode zur Schnellbestimmung des Reststickstoffs“ bedient. Diese Methode, die vom Verfasser am Serum erprobt wurde, haben wir auf ihre Brauchbarkeit für die R. N.-Bestimmung im Liquor untersucht und sie außerordentlich geeignet befunden.

Die Methode beruht darauf, daß die stickstoffhaltigen Substanzen mit Hypobromitlösung umgesetzt werden und dann das überschüssige Hypobromit jodometrisch bestimmt wird. Es hat sich dabei, wie im einzelnen in der LEIPERTschen Arbeit nachzusehen ist, gezeigt, daß KJELDAHL-Wert und Hypobromitwert des R. N. weitgehend übereinstimmen. Harnstoff und Ammoniak setzen sich sofort und quantitativ mit Hypobromit um, wogegen andere Aminoderivate, insbesondere die Aminosäuren, sich langsam umsetzen, so daß man bei längerem Einwirken der Hypobromitlauge mit der Zeit steigende R. N.-Werte erhält. Wir werden gerade auf

diese Besonderheit später noch einzugehen haben, für die Standardmethode ist es, wie LEIPERT angibt, am günstigsten, die jodometrische Titration des Hypobromitüberschusses 2 min nach Zugabe der Hypobromitlösung auszuführen. Eine kurze Beschreibung der praktischen Durchführung der Methode befindet sich am Ende dieser Abhandlung. Es erwies sich, daß die erhaltenen R. N.-Werte sehr gut reproduzierbar sind. Die Fehlerbreite beträgt bei den normalen Werten, die um 15 mg % liegen, nur $\pm 3\%$, bei niedrigeren R. N.-Werten, also unterhalb 10 mg %, erhöht sie sich auf $\pm 5\%$. Stickstoffverbindungen bekannter Mengen, die wir zu Kontrolluntersuchungen dem Liquor zusetzten (Ammonsalze und Harnstoff), konnten wir in Mengen, die zwischen 10 und 50 mg % betragen, mit einer Genauigkeit von $\pm 3\%$ bestimmen.

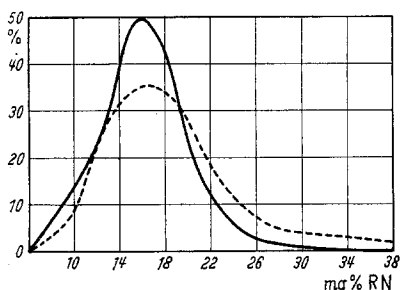


Abb. 1. ————— prozentuale Verteilung der R. N.-Werte bei normalen Liquores.
----- prozentuale Verteilung der R. N.-Werte bei patholog. Liquores.

Wir geben im folgenden einen Überblick über ein von uns nach der LEIPERTSchen R. N.-Methode untersuchtes Material von 300 Liquores, von denen 170 als „normal“ gewertet wurden, d. h. einen normalen Liquorbefund hatten. („Normal“ und „pathologisch“ beziehen sich hier nicht auf die Fälle, sondern ausschließlich auf den *Liquorbefund*, der bei uns folgendes umfaßt: Wa.R.,

MEINICKE-Klärungsreaktion II, NONNE, PANDY, Zellzahl, Gesamteiweiß nach KAFKA, Eiweißquotient und Normomastixreaktion.) Die übrigen Liquores waren als „pathologisch“ gewertet worden. Bei den normalen Liquores war der niedrigste R. N.-Wert 6,5 mg %, der höchste 36 mg %. Bei den pathologischen Liquores waren diese Werte 8,5 mg % bzw. 46 mg %. Die in der Literatur üblichen Angaben sind: R. N. bei normalen Liquores 11–15 mg %*, bei Meningitis 38–165 mg %; G. N. bei normalen Liquores 17–22 mg %, bei Meningitis 185–230 mg %, Paralyse 33 mg %². Die Extremwerte, als solche Einzelwerte, besagen wenig, interessanter erscheint es, die Verteilung der R. N.-Werte in beiden Fällen zu vergleichen.

Obenstehendes Kurvenbild zeigt den Verlauf der prozentualen Häufigkeit der einzelnen R. N.-Werte bei normalen und pathologischen Liquores.

* H. DEMME gibt (Die Liquordiagnostik, München 1950 S. 44) als normalen R. N.-Wert 12–20 mg % an, was sich sehr gut mit unseren „häufigsten“ Normwerten deckt.

Zusatz bei der Korrektur: Dies deckt sich auch mit neueren Angaben von F. LICKINT (Arch. Psych. 186, 199, 1951), der nach der KJELDAHLSchen Methode bei Normalliquor zwischen 12 und 19 mg % R. N. feststellte.

Auf der Abszisse sind die mg% R. N., auf der Ordinate die dazugehörige Anzahl der Liquores in Prozent der Gesamtzahl der untersuchten aufgetragen. Es ergeben sich, wie in solchen Fällen zu erwarten, Kurven ähnlich den MAXWELLSchen Verteilungskurven, wobei bemerkenswert ist, daß die Kurve bei den pathologischen Liquores flacher verläuft, d. h. hier machen die häufigsten, zwischen 14 und 18 mg% liegenden R. N.-Werte einen geringeren Anteil aus, wogegen die Werte oberhalb 20 mg% doppelt so häufig auftreten. (Die extrem hohen Werte in unserem Material sind durchwegs Fälle von Meningitis.)

Nun sind sowohl G. N. wie R. N. recht komplexe Größen, und es war daher gar nicht zu erwarten, daß sie, außer bei ganz „groben“ Fällen, eine deutliche Spezifität zeigen würden. Sucht man eine solche, so muß man versuchen, die Stickstoffwerte noch weiter zu differenzieren. Ein Zusammenhang mit dem Gesamteiweiß oder auch dem Eiweißquotienten hat sich nicht feststellen lassen. So fällt unter anderem auf, daß bei identischen Eiweißwerten (nach KAFKA) im Lumbal- und Occipitalliquor im letzteren der R. N.-Wert meist um 10—20% höher liegt. Bei der LEIPERTSchen Methode wird das Eiweiß durch Fällen mit Trichlor-essigsäure entfernt und von dem ausgeschiedenen Eiweiß filtriert. Es empfiehlt sich, wie wir gesehen haben, dazu ein doppeltes Filter zu verwenden, aber auch dann ist bisweilen das Filtrat noch trüb und zwar vorwiegend dann, wenn die Eiweißfällung als solche schwach war, also nur eine geringe Trübung erzeugte. Filtrate von Lösungen, die so viel Eiweiß enthielten, daß dieses ausflockte, liefen dagegen klar durchs Filter. Betrachtet man die Filtrate von der Trichlor-essigsäurefällung im UV-Licht, so zeigen die trüben eine intensive, die klaren eine schwache bis verschwindende hellblaue Fluoreszenz. Ob diese ausschließlich oder vorwiegend von Proteinen, die nicht mitgefällt wurden, stammt oder welche andere Verbindungen noch dazu beitragen, ist noch zu untersuchen. Jedenfalls ist das Auftreten einer blauen Fluoreszenz in den Filtraten nach Eiweißfällung ein Hinweis darauf, daß diese unter Umständen nicht quantitativ war. Man kann die Erscheinung auch bei den anderen Eiweißfällungsmitteln beobachten. Es leiden ja auch alle üblichen Eiweißbestimmungsmethoden darunter, daß es äußerst schwierig ist, die Proteine *völlig* und andererseits *nur* die Proteine aus einer Lösung zu entfernen. Bei kleinen Eiweißmengen bleibt die Fällung leicht unvollständig, bei größeren besteht dafür die Gefahr, daß andere gelöste Stoffe adsorptiv mitgerissen werden. Daraus erklärt sich auch die bekannte, neuerdings von K. HINSBERG und I. GLEISS³ eingehend untersuchte Tatsache, daß durchwegs die nach der KJELDAHLSchen Methode gefundenen Eiweißwerte erheblich höher liegen als die nach KAFKA bestimmten. Im ersten Fall werden, besonders bei hohen Eiweißwerten, auch andere N-Verbindungen mit erfaßt, im zweiten Fall die Proteine

nicht quantitativ gefällt. Ähnliche Feststellungen hat der eine von uns schon früher bei der spektrographischen Untersuchung pathologischer Liquores⁴ gemacht. Da zeigte sich, daß die aus der Extinktion im Bereich, in dem die Proteine ihr Absorptionsmaximum haben, errechneten Eiweißwerte nicht linear mit dem Eiweißwert nach KAFKA gingen. Die nach der Spektralanalyse geschätzten Werte lagen durchwegs höher als die nach KAFKA und dies um so mehr, je intensivere Fluoreszenz die Liquores zeigten. Obgleich man daraus schließen kann, daß das Eiweiß bei der KAFKAschen Methode nicht vollständig gefällt wurde, tragen zu der Differenz auch noch andere Verbindungen bei, insbesondere die aromatischen Aminosäuren, deren Absorption im gleichen Bereich wie die der Proteine liegt.

All diese Erscheinungen sind ein Hinweis darauf, wie vorsichtig man die Ergebnisse von Eiweißbestimmungen zu deuten hat. Selbst eine weitgehende Ähnlichkeit der Elektrophoresebilder zweier Lösungen zeigt z. B. nur, daß in den beiden Lösungen annähernd gleiche Mengen von Teilchen mit gleichem e/m enthalten sind. Eine „qualitative Übereinstimmung“ etwa von Serum- und Liquorproteinen, wie sie HINSBERG und GLEISS (a. a. O.) aus den Untersuchungen von K. F. und L. SCHEID folgern, könnte nur durch eine Bausteinanalyse der Proteine bewiesen werden.

Ein ideales Eiweißfällungsmittel für alle Konzentrationen ist nicht vorhanden, und wir haben uns deshalb bemüht, die Proteine auf andere Weise zu entfernen. Es kommt dafür die Adsorption bzw. Chromatographie in Frage. Wir versuchten es zunächst mit Kieselgel, das die Proteine quantitativ zu adsorbieren vermag, die übrigen Stickstoffverbindungen nur im geringen Ausmaß adsorbiert. Es hat aber den Nachteil, im Blindversuch bereits einen scheinbaren R. N.-Wert zu ergeben. Bei BROCKMANN-Tonerde ist dies nicht der Fall, auch hier werden, wie die Fluoreszenzkontrolle zeigt, die Proteine bis auf einen verschwindenden Anteil adsorbiert, die Aminosäuren offenbar nicht oder nur teilweise, da wir auch nach der Chromatographie im Filtrat ein Ansteigen des R. N. mit länger dauernder Einwirkung der Hypobromitlösung, wie es nach LEIPERT für Aminosäuren charakteristisch ist, beobachten konnten. Füllt man die Chromatographieröhrchen mit einer Aufschlammung von verriebe nem Aktivkohlefilter (Schleicher und Schüll, Nr. 590), so erhält man im Filtrat den niedrigsten R. N.-Wert, der übrigens über beliebige lange Zeiten unter der Einwirkung von Hypobromit konstant bleibt. Hier wurden also alle Stickstoffverbindungen mit Ausnahme von Harnstoff und Ammonsalzen adsorbiert. Die R. N.-Werte, die wir nach Filtration durch dieses Aktivkohlenfilter erhielten, lagen sämtlich unter 8 mg%. Sie liegen bei normalen Liquores um 30—35% niedriger als die nach der Standardmethode (also nach Trichloressigsäurefällung)

erhaltenen Werte, bei pathologischen Liquores um 40—50 % niedriger. Bei Füllung des Chromatographieröhrchens mit BROCKMANN-Tonerde liegen die R. N.-Werte um 0—20 % unterhalb den nach der Standardmethode erhaltenen. Beim Stehen der Lösung mit dem Hypobromitreagens nahm der R. N.-Wert in 90 min um 20—70 % zu, wogegen diese Zunahme bei den nach der Standardmethode erhaltenen Lösungen zwischen 30 und 200 % des 2-min-Wertes lag. Diese Zunahme ist beim Occipitalliquor etwa doppelt so groß wie beim Lumballiquor.

All diese Versuche zeigen, daß sich hier eine Möglichkeit bietet, die Stickstoffverbindungen des Liquor in verschiedene „Fraktionen“ aufzuteilen. Man kann dazu folgende N-Werte messen:

N_1 = Gesamt-N, nach vorhergehendem KJELDAHL-Aufschluß nach der LEIPERTschen Methode bestimmt.

N_2 = Rest-N nach Fällung mit Trichlor-essigsäure und Bestimmung nach LEIPERT nach 60 min langem Einwirken von Hypobromit.

N_3 = Rest-N nach Fällung mit Trichlor-essigsäure und Bestimmung nach LEIPERT, nach 2 min langem Einwirken von Hypobromit.

N_4 = Rest-N nach Filtrieren des Liquors durch ein mit BROCKMANN-Tonerde gefülltes Röhrchen und Bestimmung nach LEIPERT nach 2 min.

N_5 = Rest-N nach Filtrieren durch ein mit Aktivkohlefilter beschicktes Röhrchen und Bestimmung nach LEIPERT.

Trägt man diese Werte in Form eines Diagramms auf, so erhält man bei normalen Liquores etwa nebenstehendes Bild. (Abb. 2) Eine weitere Methode zur Entfernung der Proteine wäre eine Kombination von Elektrophorese und Chromatographie in der Weise, daß man an die Säule, durch welche die Liquores gegossen werden, eine Spannung anlegt, die eine Wanderung der Proteine entgegen der Durchlaufrichtung bewirkt. Daß alle derartigen Methoden nicht *vollständig* quantitativ arbeiten, weil man es immer mit Gemischen von vielerlei Substanzen zu tun hat, versteht sich. Indessen ist ja für klinische Untersuchungen angesichts der Schwankungsbreite physiologischer Größen dies gar nicht notwendig. Abweichungen von der Norm, die als pathologisch gelten dürfen und diagnostisch verwertet werden können, müssen immer weit größer als die physiologischen Schwankungen sein. An Stelle eines einzelnen, eventuell mit hoher Genauigkeit bestimmten Wertes, tritt zweckmäßiger eine Vielzahl verschiedener Werte, wie hier unsere N-Werte, die ein „Bild“ liefern, dessen Veränderungen dann ausgewertet

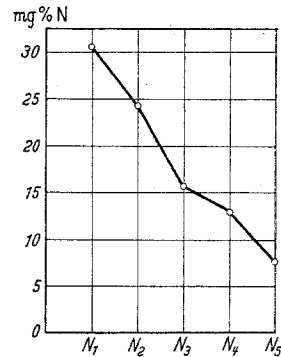


Abb. 2.

werden können. Mit der Aufstellung und der Abgrenzung der Genauigkeit einer solchen Methode sind Aufgabe und Zuständigkeitsbereich des Chemikers zu Ende. Die Deutung und Zuordnung zu Krankheitsbildern ist Sache des Klinikers.

Methodik.

Für die Standardmethode der R. N.-Bestimmung im Liquor benötigt man 0,5 ml Liquor. Sie werden zur Eiweißfällung mit 2 ml 10%iger Trichloressigsäure versetzt. Die ausgefällten Proteine werden durch ein doppeltes Filter abfiltriert, für jede Einzelbestimmung 0,5 ml verwendet, so daß man wenn nötig 4 Einzelbestimmungen machen kann, doch ist die Übereinstimmung so gut, daß man in der Regel mit 2 ausreicht. Zu den 0,5 ml des Filtrats gibt man 0,5 ml 10%ige Natronlauge und setzt dann 3 ml Hypobromitlösung zu, gibt nach 2 min einige Krystalle Kaliumjodid zu, säuert mit 3 ml Salzsäure 1:1 an und titriert das freigewordene Jod mit 0,01 n-Thiosulfatlösung unter Zusatz von 3 Tropfen Stärkeindicator (zur Zuckerbestimmung). Mit jeder Versuchsreihe ist eine Bestimmung des Leerwertes zu verbinden, bei der die Hypobromitlösung eingestellt wird, da diese nicht beständig ist. Sie erfolgt genau so, wie die andere Bestimmung mit 0,5 ml einer Mischung von 0,5 ml Wasser und 2 ml 10%iger Trichloressigsäure. Die Hypobromitlösung muß täglich neu hergestellt werden durch Zusammengeben von 1 Teil Bromlösung und 9 Teilen Boratpuffer. Die Bromlösung wird hergestellt durch Zugabe von 8 g Brom zu einer Lösung von 20 g Kaliumbromid in 50 ml Wasser und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1 l. Die Boratpufferlösung wird hergestellt durch Auflösen von 47 g Borsäure und 30 g Ätznatron in 500 ml Wasser und Auffüllen auf 1 l.

Der KJELDAHL-Aufschluß für die Bestimmung des G. N., in unserem Bild mit N_1 bezeichnet, muß ohne Zusatz von Kupfersulfat erfolgen. 1 ml Liquor wird im Veraschkungskölbchen mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt, einige Körnchen Kaliumsulfat zugesetzt und verascht. Nach dem Erkalten wird der Rückstand in ein 10-ml-Meßkölbchen gespült, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und davon jeweils für eine Bestimmung 2 ml abpipettiert. Vor Zugabe des Hypobromitreagens muß durch Zusatz von Natronlauge die Lösung alkalisch gemacht werden. Die Berechnung* erfolgt so, daß der erhaltene Thiosulfatwert vom Thiosulfatleerwert abgezogen wird. Je 1 ml dieser Differenz an Thiosulfatverbrauch entspricht 23,3 mg% R. N. bzw. G. N. des Liquors.

Zur Filtration der Liquores für die Bestimmung der Größen N_4 und N_5 verwendeten wir graduierte Röhrchen von 12 cm Länge und 5 mm lichter Weite, die in einer Höhe von 5 cm mit dem jeweiligen Adsorbens, BROCKMANN-Tonerde oder Aktivkohlefilter gefüllt waren.

Literatur.

- ¹ LEIPERT, TH.: Z. Mikrochemie 1949, S. 276. — ² MEYER, H. H.: Der Liquor, S. 68. Berlin 1949. — ³ HINSBERG, K., u. I. GLEISS: Klin. Wschr. 28, 444 (1950). — ⁴ PRUCKNER, F., u. K. F. SCHEID: Nervenarzt 9, 273 (1936). — ⁵ SCHEID, K. F., u. L. SCHEID: Arch. f. Psychiatr. (D.) 117, 219, 312, 614 (1944).

Dr. F. PRUCKNER, München 23, Kraepelinstraße 2.

* Über die Grundlage der Berechnung vgl. die eingangs erwähnte Arbeit von TH. LEIPERT, S. 279.