

Ueber die Bestimmung des Ammoniaks in thierischen Flüssigkeiten und Geweben.

Von

M. Nencki und J. Zaleski.

Mit einer Abbildung.

Aus dem chemischen Laboratorium des Instituts für experimentelle Medicin in St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Juni 1901.)

Die quantitative Bestimmung des freien oder in Form von Salzen in den thierischen und pflanzlichen Säften und Geweben enthaltenen Ammoniaks hat von jeher grosse Schwierigkeiten geboten und bis in die letzte Zeit hatten wir dafür keine zuverlässige Methode. Bis auf wenige Ausnahmen sind fast alle diese Materien eiweisshaltig und schon vor längerer Zeit hat der eine von uns gemeinschaftlich mit N. Sieber¹⁾ gezeigt, dass die verschiedensten Eiweissstoffe, namentlich bei Brutttemperatur, atmosphärischen Sauerstoff absorbiren und dabei Ammoniak abspalten. Ausserdem enthalten die Gewebe und das Blut aller Wahrscheinlichkeit nach stickstoffhaltige Substanzen, wie z. B. die Aminoverbindungen der Kohlehydrate, welche äusserst leicht unter Abspaltung von Ammoniak sich zersetzen.²⁾

Anlässlich unserer Untersuchungen über den Ammoniakgehalt des Blutes nach Anlegung der Fistel zwischen der Pfortader und der Vena cava waren wir daher genöthigt, eine neue Methode zur NH_3 -Bestimmung im Blute und den Organen auszuarbeiten. Bei der Durchsicht der hierauf bezüglichen Litteratur schien uns das im Jahre 1889 von C. Wurster³⁾ vorgeschlagene Verfahren, das Ammoniak in den thierischen Säften und Organen durch Destillation im Vacuum zu bestimmen, praktisch zu sein. Wir haben daher, auf gleichem Principe

1) Journ. f. prakt. Chemie, 26, 1 u. ff., 1882.

2) Vgl. auch C. A. Lobry de Bruyn et F. H. Leent. Rec. des travaux chimiques des Pays-Bas. T. 14, p. 140, 1895 und R. Breuer, Berl. chem. Ber., 31, 2193. 1898.

3) Berl. chem. Ber., S. 1903. 1889.

fussend, einen zweckmässigeren Apparat construirt und durch eine Reihe von Kontrollbestimmungen zu ermitteln gesucht, unter welchen Bedingungen damit der Ammoniakgehalt im Harn, in den thierischen Geweben und selbst in solchen Flüssigkeiten, die nur minimale Ammoniakmengen enthalten, wie z. B. das Blut oder die Lymphe, bestimmt werden kann. Unsere hierauf bezüglichen Untersuchungen haben wir im Jahre 1895 in dem Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. 36, S. 385 u. ff. veröffentlicht.

Wir haben dorten angegeben, dass durch Destillation der Organemulsionen mit Kalkmilch, bei einem Atmosphärendruck von 10–15 mm. und 38° C., alles darin vorhandene Ammoniak entweicht und in verdünnter Säure aufgefangen werden kann; dass dagegen Blut nicht mit Kalkmilch, sondern mit filtrirtem Kalkwasser im Vacuum destillirt werden müsse, da im ersten Falle andere Bestandtheile des Blutes unter Abspaltung von NH_3 zersetzt werden. Kontrollbestimmungen haben uns nämlich gezeigt, dass z. B. 60 g Blut, mit 100 ccm. filtrirten Kalkwassers destillirt, bis die Flüssigkeit 35° erreicht hatte, 1,8 mg NH_3 in 100 ccm. Blut gaben. Dasselbe Blut, ceteris paribus 2 Stunden lang bei 40° destillirt, gab 1,7 mg NH_3 in 100 ccm. Blut. — Ferner in einem anderen Versuche, 50 g arterielles Blut, mit 100 g filtrirten Kalkwassers destillirt, gaben 1,7 mg NH_3 in 100 g Blut. Dasselbe Blut ceteris paribus, jedoch nur mit 40 g filtrirten Kalkwassers destillirt, gab 1,6 mg in 100 g Blut.

Wir haben daraus geschlossen, dass auch bei 40° keiner der Blutbestandtheile unter Ammoniakabspaltung zersetzt werde, sowie dass selbst die doppelte Menge des zugesetzten filtrirten Kalkwassers keinen Einfluss auf die Bildung von Ammoniak habe.

Dieser Schluss erwies sich als irrthümlich, namentlich wenn kleinere Blutmengen verarbeitet wurden. Prof. Biedl in Wien machte uns brieflich darauf aufmerksam, dass die von ihm nach unserer Methode gefundenen NH_3 -Mengen erheblich geringer als die von uns gefundenen seien und in einer vorläufigen, gemeinschaftlich mit H. Winterberg¹⁾ publicirten

¹⁾ Wiener klin. Wochenschrift, 1901, Nr. 8.

Mittheilung kommt er zu dem Ergebnisse, dass der erhaltene NH_3 -Werth innerhalb gewisser Grenzen direkt abhängig sei von dem Verhältnisse der zur Bestimmung verwendeten Blut- und Kalkwassermenge.

Sie erhielten aus:

		mg NH_3 in 100 ccm. Blut
100 g Blut	+ 200 g Kalkwasser	0.44
50 „	+ 200 „	1.88
25 „	+ 200 „	4.21
in einem zweiten Versuche:		
50 g Blut	+ 100 g Kalkwasser	1.02
50 „	+ 200 „	3.25
50 „	+ 400 „	5.76

Durch die gefällige Mittheilung von Prof. A. Biedl veranlasst, haben wir Blut mit wechselnden Mengen des filtrirten Kalkwassers im Vacuum destillirt und uns von der Richtigkeit des von A. Biedl und H. Winterberger erhobenen Einwandes überzeugt. Richtige NH_3 -Werthe wurden nur erhalten, wenn 100 bis 50 ccm. Blut mit dem gleichen Volumen Kalkwasser destillirt wurden. Bei Anwendung von kleineren Blutmengen wurden schon durch die doppelte Menge des Kalkwassers die NH_3 -Werthe grösser. Bei Anwendung selbst von 100 ccm. Blut und der dreifachen Kalkwassermenge war dies ebenfalls der Fall und es scheint, wie dies von Biedl und Winterberger hervorgehoben wird, dass innerhalb gewisser Grenzen die entwickelte NH_3 -Menge direkt im Verhältniss zu der Menge des zugesetzten Kalkwassers steht. Es war klar, dass, wenn die Bestimmung des Ammoniaks durch Destillation im Vacuum eine allgemeine Anwendung finden und dabei zuverlässig sein sollte, die Anwendung selbst des filtrirten Kalkwassers ausgeschlossen war.

Von der Thatsache ausgehend, dass das Blut in 100 g höchstens einige Milligramm NH_3 enthält und der Alkaligehalt des Blutes, titrimetrisch bestimmt, etwa 300 mg in 100 g beträgt, was also mehr, als hinreichend ist, um alles NH_3 aus dem Blute auszutreiben, haben wir angenommen, dass, wenn Blut im Vacuum ohne jeden Alkalizusatz destillirt wird, auch dann alles NH_3 aus dem Blute sich verflüchtigen müsse. Diese An-

nahme hat sich, wie weiter unten gezeigt wird, als ganz zutreffend erwiesen. Aus den fein zerkleinerten und mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührten Geweben lässt sich dagegen das NH_3 im Vacuum ohne Alkalizusatz nicht verflüchtigen. Anlässlich der von dem einen von uns (Z.) gemeinschaftlich mit S. Salaskin vor Kurzem publicirten Untersuchung «Ueber die Harnstoffverbindung im Harne»¹⁾ haben wir gesehen, dass bei der Bestimmung des NH_3 im Ammoniumsulfat in unserem Vacuumapparate nach 3stündiger Destillation bei $31-32^\circ$ 99,6% von dem vorhandenen Ammoniak überdestillirten, wovon in der dritten Stunde nur 3,3% übergangen, wenn zum Freimachen des Ammoniaks nicht Kalk, sondern Magnesia angewendet wurde. Wir fanden ferner, dass auch aus carbaminsaurem Ammoniak aller Stickstoff durch Magnesia als Ammoniak frei gemacht wird. Frisch dargestelltes carbaminsaures Ammoniak wurde zwischen Fließpapier abgepresst und die Krystalle in kaltem Wasser gelöst. In 10 ccm. der Lösung wurde durch Erwärmen mit 20 ccm. $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$ und nachheriges Zurücktitiren der Gehalt an $\text{NH}_3 = 17,48 \text{ mg}$ gefunden. Andererseits wurde in je 10 ccm. der gleichen Lösung durch Destillation im Vacuum mit Magnesia 17,27 mg und 17,21 mg NH_3 gefunden. Danach unterliegt es keinem Zweifel, dass das Salz $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$ in wässriger Lösung mit MgO im Vacuum destillirt quantitativ in Ammoniak und Kohlensäure zerfällt.

Angesichts der Fehler, die bei Anwendung von überschüssigem Kalkwasser möglich sind, hielten wir es daher für wünschenswerth, zu untersuchen, ob bei Ersatz des Kalkes durch Magnesia, auch wenn letztere im Ueberschusse vorhanden, der wahre Ammoniakgehalt im Blute und in den Geweben ermittelt werden kann. Auf Grund zahlreicher Kontrollversuche glauben wir sagen zu können, dass Magnesiumoxyd wirklich diesen grossen Vorzug vor Calciumoxyd hat. Zunächst haben wir folgende Bestimmungen ausgeführt:

Je 30 g desselben frischen defibrinirten Hundesblutes — es wurden absichtlich so geringe Blutmengen genommen —

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVIII. S. 77.

wurden mit 50 g Wasser in einen Vacuumapparat gebracht und nach erfolgter gleichzeitiger Evacuierung Nr. 1 mit 50 g, Nr. 2 mit 150 g filtrirten Kalkwassers, Nr. 3 mit 50 g Kalkmilch und Nr. 4 mit einer Emulsion aus 2 g MgO in 50 g Wasser versetzt.

Wir erhielten aus:

	mg NH ₃ in 100 g Blut
1. 30 g Blut + 50 g Wasser + 50 g filtrirten Kalkwassers	0,68
2. 30 „ + 50 „ + 150 „	2,94
3. 30 „ + 50 „ + 50 „ Kalkmilch	11,53
4. 30 „ + 50 „ + 2 „ MgO in 50 g Wasser	0,76

In Nr. 1 und 4 wurde übereinstimmendes Resultat erhalten, denn der geringe Unterschied liegt innerhalb der Fehlergrenze. In Nr. 2 wurde schon mehr als die 3fache und in Nr. 3 die 16fache Ammoniakmenge gefunden.

In einem folgenden Versuche wurde absichtlich eine kleine Menge Blut mit einem grossen Ueberschuss von Magnesia und dann eine grössere Quantität desselben Blutes mit einer kleineren Menge von Magnesia destillirt.

Wir erhielten aus

	mg NH ₃ in 100 g Blut
30 g Blut + 100 g Wasser + 5 g MgO	0,84
53,75 „ + 30 „ + 1,5 „	0,65

Trotz des colossalen Ueberschusses von MgO ist die Menge des verflüchtigten NH₃ eine geringe und der Unterschied zwischen den beiden Zahlen kein erheblicher. Zur Neutralisation des NH₃ aus den 30 g Blut waren nur 0,33 ccm. von der $\frac{1}{20}$ n-Kalilauge erforderlich. Ein Unterschied von nur 0,1 ccm. dieser Lauge — also 0,23 statt 0,33 ccm. — würde 0,59 mg statt 0,84 mg in 100 g Blut entsprechen. Der Schluss ist daher berechtigt, dass im Gegensatz zum Kalk ein selbst grosser Ueberschuss von MgO keine merkliche Spaltung der übrigen stickstoffhaltigen Bestandtheile des Blutes bewirkt.

Oben haben wir angegeben, dass der Alkaligehalt des Blutes vollkommen genügt, damit das darin vorhandene NH₃ bei der Destillation im Vacuum sich vollständig verflüchtige. Es geht dies aus den Versuchen hervor, wo wir das gleiche Blut einerseits nur mit Wasser verdünnten, andererseits mit

dem gleichen Quantum Magnesiaemulsion versetzten und im Vacuum destillirten. Einem Hunde wurde Blut zuerst aus der Art. femoralis, sodann aus der Vena portae entnommen.

Wir erhielten aus

		mg NH ₃ in 100 g Blut
100 g arter. Blut	+ 100 g Wasser	0,30
100 „ „	+ 100 „ 2 ^o iger Magnesiaemulsion	0,28
100 „ Pfortaderblut	+ 100 „ Wasser	1,01
100 „ „	+ 100 „ 2 ^o iger Magnesiaemulsion	1,07

Dieser Versuch beweist auch deutlich, dass Magnesia-zusatz kein NH₃ aus den Blutbestandtheilen abspaltet. Ein Uebelstand bei der Destillation des Blutes für sich ist das starke Schäumen, was durch MgO-Zusatz bedeutend herabgesetzt wird.

Dagegen werden aus den Geweben bei fehlender Magnesia nur Spuren von NH₃ entwickelt.

Wir erhielten aus

		mg NH ₃ in „
1. 52,7 g frischer Hundemuskel	+ 100 g 2 ^o iger MgO-Emulsion	13,8
2. 55,9 „ „	+ 100 „ Wasser	0,6
3. 59,1 „ frischer Hundeleber	+ 100 „ 2 ^o iger MgO-Emulsion	31,2
4. 61,4 „ „	+ 100 „ Wasser	0,4

Wir haben mehrere Versuche angestellt, um die zweckmässigste Menge der Flüssigkeit, Dauer der Destillation und Temperatur zu ermitteln, damit alles vorhandene NH₃ verflüchtigt werde. Bezüglich der letzteren haben wir gesehen, dass es vom Vortheil ist, zwischen dem Säurerecipienten und der Luftpumpe einen Kühler mit einem Reservoir (siehe die Zeichnung auf Seite 203 *L* und *F'*) einzuschalten. Wird noch das Gefäss (*F'*) mit Eis oder Schnee abgekühlt, so geräth die Flüssigkeit in *A* schon bei 29^o in heftiges Sieden, der Druck sinkt um einige Millimeter in Folge der verminderten Spannkraft des Wasserdampfes und in ca. 5 Stunden können etwa 150—200 ccm. der Flüssigkeit aus *A* bei 32—34^o abdestillirt werden. Folgender Versuch illustriert das Gesagte:

In zwei gleiche Apparate, wovon der eine ohne Kühler, der andere mit Kühler montirt war, wurden je 250 ccm. einer Salmiaklösung, die genau 98,26 mg NH₄Cl enthielten, hinein-

gethan und nach erfolgter Evacuierung der Apparate 50 cem. der Magnesiaemulsion (mit 1,5 g MgO) hinzugesetzt. Nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden, als die Temperatur 31° erreichte, wurde zum ersten Mal der Säurerecipient (*B*) gewechselt, sodann nach 3 $\frac{1}{2}$, 4 $\frac{1}{2}$ und 5 Stunden, und das übergegangene NH₃ titrirt. Während der fünfstündigen Destillationsdauer blieb die Temperatur auf 31—32°.

Wir erhielten für die beiden Apparate folgende NH₃-Werthe:

	überdestillirtes ohne Kühler	NH ₃ in % mit Kühler
1. Nach den ersten 2 $\frac{1}{2}$ Stunden	48,72	62,37
2. In der folgenden Stunde	23,92	31,52
3. In der folgenden Stunde	10,90	4,46
4. In der folgenden Stunde	6,01	0,59

Die Destillation wurde nach 5 Stunden abgebrochen. Von dem NH₃ sind in dem Apparate ohne Kühler 89,55%, in dem mit Kühler 98,94% überdestillirt. Von den 300 cem. der Flüssigkeit in dem Gefässe (*A*) sind im ersten Falle 245 cem., im zweiten nur 140 cem. zurückgeblieben. Bei Anwendung des Kühlers geschieht daher die Verdampfung unvergleichlich rascher: dabei wird das Volumen der Flüssigkeit in dem Säurerecipienten (*B*) nicht vergrößert, da die Condensation des Wasserdampfes erst hinter dem Kühler in dem Gefässe (*F*) geschieht. Wir sehen auch hier, dass ähnlich wie bei der Destillation unter dem Atmosphärendruck die vollständige Verflüchtigung des NH₃ erst dann erreicht wird, wenn die grössere Hälfte der Flüssigkeit überdestillirt ist. Um sicher zu gehen, ist es daher zweckmässig, etwa $\frac{2}{3}$ der Flüssigkeit verdampfen zu lassen. Wir haben zu dem Zwecke das Destillationsgefäss (*A*) von 50—350 cem. in Abständen von je 50 cem. calibrirt, um das Quantum der abgedampften Flüssigkeit zu kennen. Da wir ferner empirisch ermittelt haben, dass, sobald die Temperatur des äusseren Bades (*M*) 35° erreicht hat, dann die Temperatur im Gefässe (*A*) 30° ist, so passen wir bei der Destillation nur darauf, dass die Temperatur des Bades (*M*) nicht mehr als 35—37° beträgt, und erachten die Bestimmung als beendet, wenn ca. $\frac{2}{3}$ der Flüssigkeit aus dem Gefässe (*A*)

verdampft sind. Beim Einhalten dieser Maassregel ergaben uns drei Kontrollbestimmungen mit der gleichen Salmiaklösung: 99,56%, 99,8% und 100,27% von dem zugesetzten NH_3 .

Von vornherein konnte man erwarten, dass in der gleichen Zeit ein kleineres Flüssigkeitsquantum relativ rascher als ein grösseres verdunsten wird, wenn auch, absolut genommen, im zweiten Falle das Quantum des verdunsteten Wassers ein grösseres sein muss. Auf die Verflüchtigung des Ammoniaks hat jedoch die Menge des übergegangenen Wassers keinen merklichen Einfluss. Wir haben in einem Versuche Rinderblut, das zwei Tage vorher dem Thiere entnommen war, in drei Partien zu je 100 ccm. zu gleicher Zeit und an gleicher Pumpe und zwar in der Art destillirt, dass in Nr. I 100 ccm. Blut ohne jeden Zusatz, in Nr. II 100 ccm. Blut mit 100 ccm. 2%iger Magnesiaemulsion und in Nr. III 100 ccm. Blut + 100 ccm. Magnesiaemulsion + 100 ccm. Wasser destillirt wurden. Als in Nr. I $\frac{2}{3}$ der Flüssigkeit übergangen, wurde die vorgelegte Schwefelsäure in allen drei Apparaten zurücktitrirt, hierauf neue Säure vorgelegt und die Destillation so lange fortgesetzt, bis aus Nr. I alles Wasser überdestillirte. Wir erhielten folgendes Resultat:

	Nr. I	Nr. II	Nr. III
Ursprüngliche Menge der Flüssigkeit . .	100 ccm.	200 ccm.	300 ccm.
Zurückgebliebene Menge der Flüssigkeit	30 ccm.	100 ccm.	180 ccm.
Verbrauchte $\frac{1}{20}$ n-Kalilauge in ccm. zum Zurücktitriren der Schwefelsäure . . .	1,95	1,8	1,98
Erhaltenes NH_3 in mg für 100 ccm. Blut	1,64	1,51	1,66
Flüssigkeitsmenge bei fortgesetzter Destillation	0 (fester Rückstand)	65	150
Verbrauchte $\frac{1}{20}$ n-Kalilauge in ccm. zum Zurücktitriren der Schwefelsäure . . .	0,2	0,4	0,3
Erhaltenes NH_3 in mg für 100 ccm. Blut	0,17	0,34	0,25
Total erhaltenes NH_3 in mg für 100 ccm. Blut	1,81	1,85	1,91

Wie aus diesen Zahlen ersichtlich, ist, nachdem in Nr. I $\frac{2}{3}$ des Blutes abdestillirt sind, unabhängig von der Verdünnung auch in Nr. II und III, die gleiche Menge NH_3 erhalten worden. Bei weiterem Destilliren, wobei in Nr. I das Blut bis zur Trockne verdampft wurde, sind noch minimale Mengen von NH_3 entwickelt worden. Diese Mengen sind beim Blute so gering, dass sie füglich vernachlässigt werden könnten. Anders war es bei unseren Versuchen mit den Organen, falls sie nicht zu ganz homogenem Brei verrieben wurden. Während das auf $\frac{2}{3}$ abdestillirte Blut bei weiterer Destillation bis zur Trockne nur Spuren von NH_3 entwickelte, so dass beim Zurücktitriren der vorgelegten Säure wir 0,1 ccm., höchstens 0,2 ccm. der $\frac{1}{20}$ n-KOH weniger verbrauchten, waren es bei den auf $\frac{1}{3}$ abdestillirten Organemulsionen bei weiterer Destillation zur Trockne manchmal 4 ccm. der $\frac{1}{20}$ n-KOH, die wir beim Zurücktitriren der Säure weniger verbrauchten. Dadurch wurden Differenzen erhalten, die am besten durch folgende Zahlen illustriert werden.

Wir erhielten z. B. in 100 g des frischen Gewebes:

Aus Hundemuskel	11.54	und	12.31	mg NH_3
»	8.80	»	10.60	»
Hundeleber	26.42	»	28.97	»

Die Ursache dieser Erscheinung liegt in dem nicht vollständigen Eindringen der Magnesia in das zerkleinerte Gewebe. Wir haben daher das zerhackte Gewebe noch durch die Fleischhackmaschine passiren lassen oder im Mörser mit mit Salzsäure ausgewaschenem und ausgeglühtem Meersand verrieben. Dadurch gelang es uns, die Differenzen in den Bestimmungen soweit zu beseitigen, dass für 50 g des Gewebes der Unterschied in der verbrauchten $\frac{1}{20}$ n-Kalilauge 1 ccm., höchstens 2 ccm. betrug. Ein Uebelstand dabei besteht darin, dass, um allen Inhalt aus dem Mörser in das Gefäss (A) zu bringen, ziemlich viel Wasser zum Nachspülen nöthig ist und in Folge dessen die Destillation etwas länger dauert.

Wenn wir nun alles oben Gesagte resumiren, so ist unser jetziges Verfahren zur Bestimmung des NH_3 im Blute und den Geweben wie folgt:

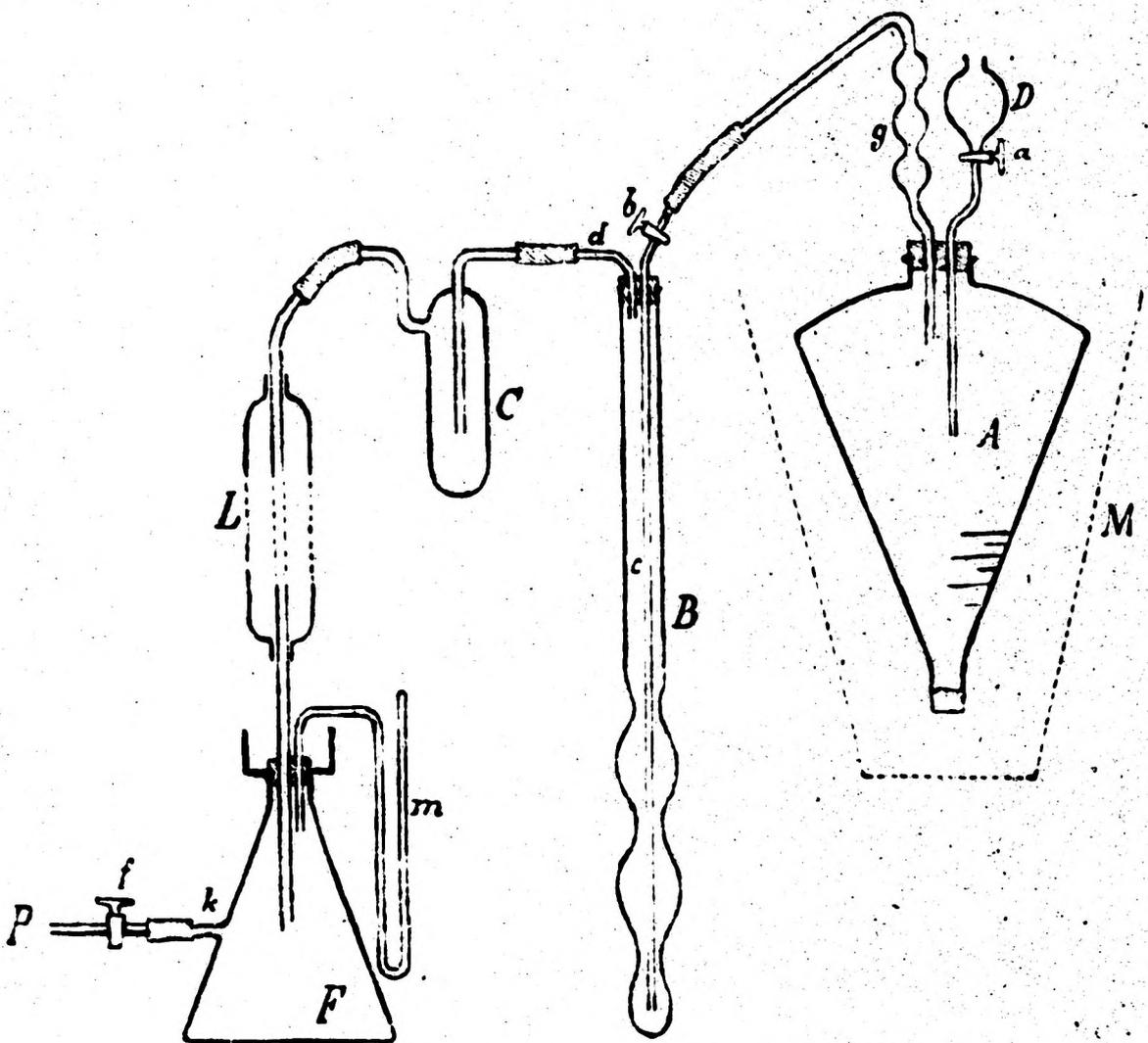
Zur Destillation dient das conische dickwandige Gefäss (*A*) (siehe die Figur) von 1,5—2 Liter Inhalt. Die obere und untere Oeffnung haben 4 cm. im Durchmesser und sind zwecks luftdichten Verschlusses matt geschliffen. Die untere Oeffnung hat bei den Analysen zwar keine Bedeutung, erleichtert aber sehr die Reinigung des Gefässes nach dem Gebrauch und wird mit einem Kautschukkorke geschlossen.

Nachdem das Gefäss (*A*) in dem Wasserbade (*M*) passend befestigt worden, wird die obere Oeffnung mit einem doppelt durchbohrten Kautschukkorke geschlossen. Durch die eine Bohrung geht hindurch das Rohr des Scheidetrichters (*D*), durch die andere das dreikugelige Ableitungsrohr (*g*), das mittelst dickwandigen Kautschukschlauches mit dem Röhrechen *c* verbunden ist. Das Gefäss (*B*) von 17 mm. Durchmesser und 42 cm. Länge mit drei kugeligen Ausbuchtungen ist der Recipient für die titrirte Schwefelsäure. Der Recipient (*B*) wird ebenfalls mit einem doppelt durchbohrten Korke geschlossen, worin das Zuleitungsrohrechen (*e*) mit dem Hahnen (*b*) und das Ableitungsrohrechen (*d*), das durch dickwandigen Kautschukschlauch mit der Flasche (*C*) verbunden ist, stecken. Die Waschflasche (*C*) ist sodann mit dem Liebig'schen Kühler und dieser mit der Reservoirflasche (*F*) verbunden. — (*m*) ist Manometer und mittelst des seitlichen Rohrs (*k*) ist die Flasche (*F*) und damit das ganze System mit der Wasserstrahlpumpe verbunden.

Die zu untersuchende Substanz — Blut oder Gewebe — wird bis auf 0,1 g genau abgewogen in das Gefäss (*A*) gebracht. Bei Analysen des Blutes, das nur wenig NH_3 enthält, nehmen wir nicht weniger als 100 g. Erheblich grössere Mengen zu nehmen, ist auch unpraktisch, da das Blut im Vacuum stark schäumt, was die Destillation verzögert, und ausserdem kann die Flüssigkeit leicht in das Gefäss (*B*) übersteigen. Von den Organen genügen 40—50 g, die vorher möglichst fein mit gereinigtem Meersand verrieben werden: vom Harn verwendeten wir 20—30 cem., doch genügen auch viel kleinere Quantitäten. In das Gefäss (*B*) werden mittelst einer genau calibrirten Pipette bei der Destillation des Blutes

10 ccm., bei der der Gewebe 20 ccm. $\frac{1}{10}$ n-Schwefelsäure gebracht, die nach Beendigung der Destillation mit $\frac{1}{20}$ n-Kalilauge zurücktitriert werden. Für Harn, je nach der genommenen Menge, sowie für ammoniakreichere Flüssigkeiten muss die SO_4H_2 und auch die KOH-Lauge entsprechend concentrirter sein.

Nachdem die einzelnen Theile des Apparates mit einander verbunden, wird zunächst die Luft evacuirt. Der Hahn (*a*) wird geschlossen, der Hahn (*b*) anfangs halb geöffnet, damit



die rasch aufsteigenden Luftblasen in den Recipienten (*B*) nicht hinübergerissen werden; später wird er ganz geöffnet. Während des Evacuirens werden die Gummistöpsel in den Gefässen (*A*) und (*B*), sowie eventuell die Kautschukverbindungen mit geschmolzenem Paraffin luftdicht gemacht. Man lässt Wasser durch den Kühler fließen und auch das Reservoir (*F*) wird durch Schnee oder kaltes Wasser gekühlt. Zeigt das Manometer einen Druck von 15—10 mm. und passiren die Gasblasen durch den Recipienten (*B*) langsam, so wird der

Hahn (*b*) geschlossen und durch den Scheidetrichter (*D*) 50 ccm. der 2^o sigen Magnesiaemulsion hinzugegossen. Jetzt wird der Hahn (*b*) von Neuem geöffnet und wenn die Gasentwicklung nachgelassen hat, beginnen wir mit dem Erwärmen des Wasserbades (*M*). Die Steigerung der Temperatur muss, namentlich bei der Destillation des Blutes, sehr langsam geschehen, 2—4 Stunden, bis sie 35° erreicht hat, und die ganze Zeit auf 35—37° gehalten werden. Sind ca. $\frac{2}{3}$ der Flüssigkeit aus dem Gefässe (*A*) überdestillirt, was im Ganzen etwa 5—6 Stunden beansprucht, so kann die Destillation als beendet betrachtet werden. Zunächst wird die Kautschukverbindung zwischen dem Gefässe (*C*) und dem Kühler (*L*) mittelst Klemmschraube geschlossen. Ebenso der Hahn (*b*) und durch den Hahn (*a*) wird in das Gefäss (*A*) Luft hineingelassen. Hierauf wird die Kautschukverbindung zwischen (*g*) und (*e*) losgelöst und durch vorsichtiges Oeffnen des Hahnes (*b*) die Luft in (*B*) und (*C*) hineingelassen. Hierbei kann es passiren, dass durch zu rasches Oeffnen des Hahnes (*b*) die Luft so heftig in (*B*) eindringt, dass ein Theil der Säure nach (*C*) hinübergeschleudert wird. Sind (*B*) und (*C*) mit Luft gefüllt, so wird der Inhalt dieser beiden Gefässe in ein Becherglas gegossen, die Wände sorgfältig mit Wasser nachgespült und die Säure zurücktitrirt. Als Indicator empfehlen wir die Mischung von Lacmoid mit Malachitgrün. — 10 g Lacmoid werden in 150 ccm. Alkohol gelöst, filtrirt und zu dem Filtrate 10—15 ccm. einer Lösung von 1 g Malachitgrün in 50 ccm. Alkohol hinzugesetzt. — Bei den minimalen Mengen von NH_3 , um die es sich hier handelt, ist die absolute Reinheit der Reagentien selbstverständlich und sind das verwendete destillirte Wasser, sowie die Magnesia vor ihrem Gebrauche auf den eventuellen Gehalt an NH_3 genau zu prüfen; aber auch die Reinheit der Gefässe und der Laboratoriumsluft muss nicht ausser Acht gelassen werden. Das Blut und die Organe müssen in einigen Stunden nach der Verblutung des Thieres verarbeitet werden. Wiederholt haben wir gesehen, dass das Blut und die Gewebe schon nach 24stündigem Aufbewahren selbst in der Kälte einen etwas höheren NH_3 -Gehalt als Tags-

vorher zeigten. Da wo bei einer Reihe von Bestimmungen wir nicht alle am selben Tage ausführen konnten, haben wir weniger zersetzliche Organe wie Muskel, Milz, Nieren mit Salicylsäure bestreut und auf Eis bis zum nächsten Tage aufbewahrt. Wie oben angegeben, wird aus dem Blute bei der Destillation vermöge seines Alkaligehaltes auch ohne Magnesia-zusatz alles NH_3 ausgetrieben. Es ist hierbei zweckmässig, das Blut mit dem halben Volumen Wasser zu verdünnen, wodurch das Schäumen sehr vermindert wird. Bei den Organen ist die Herstellung einer möglichst dünnbreiigen Emulsion durch Verreiben mit Sand nothwendig. Für 50 g des Gewebes genügen hierzu etwa 200 g Wasser, was mit dem nachherigen Zusatz von 50 g 2%iger Magnesiaemulsion 300 g Flüssigkeit ausmacht. Harn wird mit dem 3—5fachen Volumen Wasser verdünnt.

Dass das im Vacuum entweichende Alkali wirklich Ammoniak ist, davon haben wir uns durch direkten Versuch überzeugt. Eine aus dem Blute und den Organen zweier Hunde zurücktitrirte schwefelsaure Lösung sollte der Titration zu Folge 0,1958 g NH_3 enthalten. Diese Lösung wurde mit überschüssiger Kalilauge destillirt, das Destillat in Salzsäure aufgefangen, die salzsaure Lösung auf dem Wasserbade verdunstet und mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Der abgeschiedene Platinsalmiak wurde mit Aetheralkohol nachgewaschen, getrocknet und geglüht. Das Gewicht des erhaltenen Platins war = 1,0647 g entsprechend 0,1866 g NH_3 . Demnach konnte das verflüchtigte Ammoniak nur minimale Mengen höherer Homologe — vielleicht Methyl- und Trimethylamin — enthalten.

Nach diesem verbesserten Verfahren wurden von dem einen von uns (Z.) gemeinschaftlich mit Dr. W. Horodyński eine grosse Anzahl von NH_3 -Bestimmungen im Blute der verschiedenen Gefässbezirke und den Organen unter den verschiedensten Ernährungsverhältnissen bei Hunden ausgeführt und soll eine ausführliche Mittheilung der erhaltenen Resultate demnächst in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden. Gewöhnlich wurde das Blut zuerst aus der Art. femoralis, hierauf aus der Pfortader und ihren Aesten, dann noch aus anderen

Gefässen entnommen und schliesslich liessen wir das Thier aus der Arterie verbluten. Im Mittel aus 15 Bestimmungen erhielten wir, mit geringen Schwankungen, wenn das Blut, wie oben angegeben, entnommen wurde, für das arterielle Hundesblut 0,35 mg und für das Pfortaderblut 1,45 mg für 100 g Blut. Wurde das arterielle Blut gegen Ende der Verblutung entnommen, so enthielt es, offenbar in Folge der Auswaschung der Organe, stets etwas mehr NH_3 — im Mittel 0,52 mg. — Das Pfortaderblut enthält daher 2,8—4 mal mehr NH_3 als das arterielle. — Für die einzelnen Organe wurden dagegen bei der Destillation mit Magnesia ziemlich die gleichen Werthe wie früher mit Kalk erhalten. Den höchsten NH_3 -Gehalt ergab auch jetzt die Magenschleimhaut, dann die Darmschleimhaut, die Leber und das Pankreas und es frägt sich, warum gerade im Blute die grössten Differenzen bei der Destillation mit Kalk resp. Magnesia erhalten wurden. Es müssen im Blute Stoffe vorhanden sein, die nur ein wenig beständiger als das carbaminsaure Ammoniak sind. So zersetzt sich z. B. nach R. Breuer¹⁾ das freie Chitosamin schon in wässriger Lösung ungemein rasch unter Abspaltung von NH_3 . Wie schon Eingangs erwähnt, spalten auch Eiweissstoffe in alkalischer Lösung bei der Bruttemperatur unter Sauerstoffabsorption Ammoniak ab. Wir haben gemeinschaftlich mit Herrn Popoff die früheren Versuche hierüber von Nencki und Sieber²⁾ mit reinem krystallisirten Serumalbumin, mit Serumglobulin und dem Oxyhämoglobin aus Pferdeblut wiederholt.

Die Ermittlung des absorbirten Sauerstoffs geschah, wie in den früheren Versuchen, durch Bestimmung des Sauerstoffs in der mit der Eiweisslösung miteingeschlossenen Luft. Die Eiweisslösungen wurden in eine starkwandige Flasche, von der Form wie die Flasche (F) in unserer Zeichnung, nur ohne das seitliche Ansatzrohr (k), von genau bekanntem Inhalt (circa 2 Liter) gebracht. Der Hals der Flasche wurde mit einem doppelt durchbohrten Kautschukkorke geschlossen. In

1) Berl. chem. Ber., **31**, 2195. 1898.

2) Journ. für prakt. Chem., Bd. 26, S. 6. 1882.

der einen Bohrung befand sich das Ableitungsröhrchen, in der anderen ein dünnwandiges in die Flasche hineinragendes Glasrohr, unten offen, oben spitz ausgezogen, durch welches nach Beendigung des Versuches in die Flasche Quecksilber hineingegossen wurde. Nach Zusatz einer abgewogenen Menge des festen Kalihydrats zu der Flüssigkeit wurde der Kautschukkork aufgesetzt und in die Erweiterung des Flaschenhalses, zwecks luftdichten Verschlusses, Quecksilber gegossen. Nach etwa einer Stunde, als der Flascheninhalt die Temperatur des Zimmers angenommen, haben wir die Temperatur und den Barometerstand notirt, das Ende des Ableitungsrohrs zugeschmolzen, und jetzt liessen wir die Flaschen 3—6 Wochen lang im Thermostaten bei 37° stehen, wobei sie zeitweise be- sichtigt und ihr Inhalt umgerührt wurde. Nach beendigter Versuchsdauer wurde die Luft durch Eingiessen von Quecksilber durch das dünnwandige Glasrohr — die Spitze des Glasrohrs wurde mit Kautschukschlauch überzogen und nach Eingiessen des Quecksilbers in den Schlauch unter Quecksilber abgebrochen: ebenso wurde die Spitze des Ableitungsrohrs unter Endiometer abgebrochen — aus der Flasche herausgetrieben und in einem genau abgemessenen Volumen der Gehalt an Sauerstoff durch alkalische Pyrogallollösung bestimmt.

Relativ die grösste Menge Sauerstoff absorbirte das unkrystallisirte Oxyhämoglobin aus Pferdeblut — 250 ccm. der Lösung, die 7,5675 g Hämoglobin und 2 g KOH oder 3,027 % Hämoglobin und 0,8 % KOH enthielt, absorbirte nach 49 Tagen 0,2939 g Sauerstoff oder 3,88 % vom Gewichte des Hämoglobins. — Die gleiche Menge der Lösung mit 5 g KOH, also 3,027 % Oxyhämoglobin und 2,0 % KOH, absorbirten nach gleicher Zeitdauer 0,3866 g oder 5,10 % Sauerstoff. — Die miteingeschlossene Luft = 1573 ccm. enthielt am Ende des Versuches nur 3,7 % Sauerstoff.

200 ccm. einer 1,83 %igen Lösung von krystallinischem Serumalbumin + 1,5 KOH absorbirten während 21 Tagen 0,0961 g Sauerstoff = 1,9 % vom Gewichte des Eiweisses in 0,75 % iger Kalilösung.

200 ccm. dergleichen Lösung + 5 g KOH absorbirten in der gleichen Zeit 0,07784 g Sauerstoff oder 2,12% in 2,5%iger Kalilösung.

300 ccm. einer 1,726%igem Serumglobulinlösung + 2 g KOH absorbirten während 24 Tagen 0,0600 g Sauerstoff oder 1,14% vom Gewichte des Globulins in 0,66%iger Kalilösung.

300 ccm. dergleichen Lösung + 6 g KOH absorbirten in der gleichen Zeit 0,0941 g Sauerstoff = 1,8% in 2%iger Kalilösung.

350 ccm. einer 1,66%igen Lösung von Serumglobulin + 17,5 g KOH verblieben im Thermostaten 29 Tage. Die Menge des absorbirten Sauerstoffs war = 0,1400 g oder 2,4% vom Gewichte des Globulins in 5,8%iger Kalilösung.

In diesem Versuche wurde die Menge des vorhandenen Ammoniaks vor Beginn und am Schlusse des Versuches nach unserer Methode bestimmt. Wir erhielten folgende Werthe:

	Erhaltenes NH ₃ in Milligrammen für 100 g der Lösung
1. Globulinlösung nur mit MgO destillirt . . .	1,50
2. mit 5,8% Kali	5,63

Nach 29tägigem Stehen im Thermostaten:

3. Destillation mit MgO (die alkalische Lösung wurde vorher mit SO ₄ H ₂ schwach sauer gemacht)	28,5
4. Destillation, ohne vorher das Alkali zu neutralisiren	38,2

Wir brauchen kaum zu erwähnen, dass eine Betheiligung der Spaltpilze an der Sauerstoffabsorption in diesen Versuchen ganz ausgeschlossen war. Abgesehen davon, dass alle Gefässe vorher sterilisirt und die Eiweisslösungen durch Chamberlandkerzen direkt in die Absorptionsflaschen hineinfltrirt wurden, würde schon der Alkaligehalt der Lösungen das Wachstum der Bacterien hindern. — Die Lösungen waren in der That nach Beendigung der Versuche vollkommen klar und geruchlos und erwiesen sich bei Ueberimpfungen als steril. Die alkalischen Eiweisslösungen, mit verdünnter Essigsäure neutralisirt, gaben geringe Niederschläge, die Filtrate davon gerannen nicht beim Kochen, gaben die Biuretreaction und durch Fällung mit

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ resp. Alkohol konnten darin Proto- und Deuteroalbumosen in reichlicher Menge nachgewiesen werden. Krystallinische Produkte waren darin nicht vorhanden. Auch die Oxyhämoglobinlösungen, die nach Beendigung des Versuches dunkelbraun gefärbt waren und spectroscopisch das Absorptionsband des Hämatins in alkalischer Lösung zeigten, enthielten Proto- und Deuteroalbumosen, gaben Biuretreaction, aber krystallinische Spaltungsprodukte haben wir in den Lösungen nicht gefunden.

Wenn wir uns noch vergegenwärtigen, dass nach einem früheren Versuche von Nencki und Sieber¹⁾ Eiereiweiss in 0.5%iger Sodalösung ebenfalls Sauerstoff absorbiert, so könnten die minimalen Mengen des NH_3 im arteriellen Blute einer Autooxydation der Proteinstoffe ihren Ursprung verdanken. Nach unserer Ansicht stammt jedoch das NH_3 des Blutes aus dem Stoffwechsel der Gewebe, d. h. der Muskel und der drüsigen Organe ab, ganz besonders aber von den chemischen Processen in der Magen- und Darmschleimhaut, und darin ist hauptsächlich die Ursache für den 3—4 mal höheren NH_3 -Gehalt der Pfortader zu suchen. Natürlich kommt hier auch das in dem Darminhalt gebildete NH_3 in Betracht. Ausser dem NH_3 , das im Blute wohl nur als Carbaminsäure vorkommt, müssen darin noch leicht zersetzbare Stoffe enthalten sein, die nicht durch Magnesia, aber durch überschüssiges Kalkwasser bei der Bruttemperatur unter Freiwerden von NH_3 sich zersetzen.

1) l. c., S. 10.