

Über die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

Von

Fr. Kutscher und H. Stendel.

Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

Mitgeteilt von H. Stendel.

(Der Redaktion zugegangen am 20. Mai 1903.)

Die Methode zur quantitativen Bestimmung des Stickstoffs, die Johann Kjeldahl im Jahre 1883 in der Zeitschrift für analytische Chemie¹⁾ veröffentlicht hat, hat sich so rasch wie keine zweite, besonders in den physiologisch-chemischen Laboratorien, eingebürgert. Kontrollanalysen, die gleich nach der Veröffentlichung Kjeldahls von Nachuntersuchern gemacht waren, hatten die Zuverlässigkeit der neuen Methode scheinbar genügend bewiesen und die wenigen einfachen Manipulationen, die zur Ausführung einer Analyse nötig waren, waren so leicht zu lernen und mit Sicherheit zu beherrschen, daß die neue Stickstoffbestimmung sich besonders rasch zahlreiche Anhänger erwarb. Mit geringen Modifikationen der ursprünglichen Angaben Kjeldahls wird die Methode heute überall da angewandt, wo es gilt, rasch in tierischen oder pflanzlichen Geweben und Flüssigkeiten sich über die Menge des Stickstoffs zu unterrichten. Ein besonderer Vorteil der Kjeldahlschen Methode ist es weiter, daß man eine sehr große Anzahl Analysen neben einander machen kann, ein Vorteil, der besonders für die Erforschung des Stoffwechsels fruchtbar gewesen ist. Solange es sich nun nur darum handelte, in Gemengen heterogener, teilweise unbekannter Körper die Summe

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Chem., Bd. 22, 366.

des Stickstoffs zu finden, z. B. die Menge des Stickstoffs im Fleisch, Brot, Harn zu bestimmen, war die Methode Kjeldahls sicher am Platze: als man aber auch dazu überging, sie auf einzelne chemische Individuen zu übertragen, und in der Praxis anfang, aus der Menge des gefundenen Stickstoffs in einem Niederschlage oder in einer Flüssigkeit die Menge irgend eines gesuchten Körpers theoretisch zu berechnen und diese Zahl weiteren Spekulationen zugrunde zu legen, mußte man sich doch fragen, ob wirklich jedesmal der bis heute noch nicht aufgeklärte Reaktionsmechanismus bei der Veraschung mit konzentrierter Schwefelsäure quantitativ genug verlaufe, um aus der Menge des gebildeten Ammoniaks auf die Menge des in der Substanz enthaltenen Stickstoffs Rückschlüsse machen zu dürfen.

Daß bei ganzen Gruppen von Körpern die Methode versage, war längst bekannt, Nitro-, Cyan- etc. Verbindungen ließen sich nicht oder doch nur nach gewissen Vorbereitungen nach Kjeldahl analysieren. Diese Verbindungen kamen aber dem physiologischen Forscher nur selten in die Hand, bei Stoffwechseluntersuchungen war ihr Vorkommen so gut wie ausgeschlossen; dagegen galt es von sämtlichen stickstoffhaltigen Verbindungen, die physiologisch in Betracht kommen, für feststehend, daß sie quantitativ ihren Stickstoff bei der Veraschung nach Kjeldahl als Ammoniak abgeben, und wir haben in der äußerst umfangreichen Stoffwechselliteratur, in der alle erdenklichen Fragen behandelt werden, keine einzige Arbeit gefunden, in der dieses Fundamentaldogma der modernen Stoffwechselmethodik auch nur einem leichten Zweifel begegnet wäre. Inwieweit nun der Methode von Kjeldahl Zuverlässigkeit beizumessen sei, mögen folgende Beispiele zeigen:

Wir wollten Kreatin, das wir gelegentlich einer anderen Untersuchung aus Fleischextrakt gewonnen hatten, auf seine absolute Reinheit prüfen und deshalb seinen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmen, erhielten aber stets zu niedrige Werte, die sich auch nicht änderten, als wir die Substanz zu wiederholten Malen aufs peinlichste und sauberste gereinigt und umkrystallisiert hatten.

Wir erhitzen die Substanz, 0,15—0,2 g, mit 10 ccm konz. Schwefelsäure und einem bohngroßen Stück CuSO_4 etwa 10 Minuten in einem Kolben aus Jenenser Glas zu 500 ccm auf freiem Feuer zum lebhaften Sieden, ließen erkalten, und nachdem wir mit einer Messerspitze Kaliumpermanganat oxydiert hatten, erhitzen wir wieder bis zum Sieden und behandelten dann das Reaktionsgemisch in bekannter Weise weiter.

Die Analysen führten zu folgenden Resultaten: Theoretischer Prozentgehalt an Stickstoff im krystallwasserhaltigen Kreatin ist 28,23 %.

0,1580 g	gaben	0,03766 g	Stickstoff	=	23,84 %	N.	Differenz:	—	4,39
0,2244	»	0,05656	»	=	24,63 %	»	»	—	3,60
0,1518	»	0,03374	»	=	22,23 %	»	»	—	6,00
0,1538	»	0,04200	»	=	27,31 %	»	»	—	0,92
0,1700	»	0,04438	»	=	26,10 %	»	»	—	2,13

Titration in dem aufgekochten und wieder erkalteten Destillat änderte an den Resultaten nichts.

Daß unsere Substanz trotzdem reines Kreatin war, konnten wir leicht durch eine Stickstoffbestimmung nach Dumas beweisen: hierbei lieferte das gleiche Präparat folgende Werte: 0,1378 g: 33,6 ccm N ($t = 11^\circ$, $p = 74,6$ cm) = 28,65 % N. Differenz. + 0,42

Woher kam nun diese anscheinende Regellosigkeit in der Abspaltung des Stickstoffs?

Wir ließen zunächst die Oxydation mit Kaliumpermanganat fort, da wir bei der Veraschung des Kreatins nur eine schnell verschwindende leichte Bräunung beobachtet hatten und weil wir fürchteten, daß wir durch energische Oxydation einen Teil des Ammoniaks verlieren könnten; Kjeldahl selbst hat allerdings diese Befürchtung schon in seiner ersten Publikation als grundlos nachgewiesen.

0,1609 g	gaben	0,04452 g	N	=	27,67 %	Differenz	—	0,56
0,1584	»	0,04326	»	=	27,31 %	»	—	0,92

Ebenso lieferte eine Veraschung ohne Kupfersulfat, bei der die Flüssigkeit ebenfalls sich zu Anfang nur leicht verfärbte und dann wasserklar blieb, zu wenig Ammoniak:

0,1622 g	gaben	0,04452 g	N	=	27,45 %	Differenz	—	0,78
----------	-------	-----------	---	---	---------	-----------	---	------

Dagegen schien es uns, als wenn die Menge des Kupfersulfats mit der Größe des Stickstoffverlustes in einer gewissen Beziehung stünde, und wir haben dann eine Reihe von Bestimmungen mit wechselnden Mengen Kupfersulfat gemacht: zunächst lassen wir eine Analyse folgen, in der wir etwa die dreifache Menge CuSO_4 wie gewöhnlich anwandten.

0,1506 g gaben 0,03682 g N = 24,45 % . Differenz — 3,78

Wie bei allen vorigen Analysen, so wurden auch hier die letzten Spuren Ammoniak nur äußerst langsam abgegeben, in diesem Falle haben wir mit neuvorgelegter Säure noch eine Viertelstunde weiter erhitzt, konnten aber in der Vorlage keine nachweisbare Menge Ammoniak nachweisen. Bei Zusatz von 2 g CuSO_4 zur Veraschungsflüssigkeit erhielten wir:

0,1494 g gaben 0,03836 g N = 25,67 % . Differenz — 2,56

0,1408 „ „ 0,03654 „ „ = 25,95 % „ „ — 2,28

Bei Zusatz von 5 g CuSO_4 lieferten:

0,1560 g 0,04074 g N = 26,12 % . Differenz — 2,11

Unsere übrigen Analysenresultate lassen wir in tabellarischer Übersicht folgen. Wir haben mit wechselnden, gewogenen Mengen Kupfersulfat verascht, haben teils eine Oxydation mit Kaliumpermanganat folgen lassen, teils nicht, und haben vor allem die Zeit des Kochens variiert, da uns die bald nach Beginn des Versuches klar gewordene Reaktionsflüssigkeit nicht anzeigte, wie lange das Kochen fortgesetzt werden sollte. Bei der Destillation des gebildeten Ammoniaks gingen übelriechende alkalisch reagierende Dämpfe äußerst langsam über, so daß sie selbst noch nach 1½ stündigem Destillieren nachweisbar waren. Ihre Menge war aber äußerst gering und ließ sich, war die Hauptmenge des Ammoniaks einmal übergegangen, quantitativ nicht bestimmen.

Kreatin, verascht mit 10 cem konz. H_2SO_4 .	Koch- dauer	Diffe- renz	Koch- dauer	Diffe- renz	Koch- dauer	Diffe- renz
	5 Min.		10 Min.		20 Min.	
Ohne CuSO_4 , ohne Pmg.	25,68 %	— 2,55	27,22 %	— 1,01	28,02 %	— 0,21
	24,02 %	— 3,21	27,67 %	— 0,56	—	—
	25,45 %	— 2,78	27,35 %	— 0,88	—	—
	—	—	26,97 %	— 1,26	—	—

Kreatin, verascht mit 10 cem konz. H ₂ SO ₄	Koch- dauer 30 Min.	Diffe- renz	Koch- dauer 60 Min.	Diffe- renz		
Ohne CuSO ₄ , ohne Pmg. . .	28,25 %	+ 0,02	27,71 %	- 0,52		
Kreatin, verascht mit 10 cem konz. H ₂ SO ₄	Koch- dauer 20 Min.	Diffe- renz	Koch- dauer 25 Min.	Diffe- renz		
- 0,03 CuSO ₄ ohne Pmg. .	28,23 %	- 0,00	27,82 %	- 0,41		
Kreatin, verascht mit 10 cem konz. H ₂ SO ₄	Koch- dauer 20 Min.	Diffe- renz	Koch- dauer 25 Min.	Diffe- renz	Koch- dauer 30 Min.	Diffe- renz
+ 0,5 CuSO ₄ ohne Pmg.	27,42 %	- 0,81	28,34 %	+ 0,11	27,55 %	- 0,68
Kreatin, verascht mit 10 cem konz. H ₂ SO ₄	Koch- dauer 20 Min.	Diffe- renz	Koch- dauer 25 Min.	Diffe- renz		
+ 2 g CuSO ₄ ohne Pmg. .	27,66 % 27,20 %	- 0,57 - 1,03	27,34 %	- 0,89		
Verascht mit 10 cem konz. H ₂ SO ₄				Koch- dauer 20 Min.	Diffe- renz	
Ohne CuSO ₄ , nachfolgende Oxydation mit 1 g Pmg. . .				28,28 %	+ 0,05	
- 0,03 g CuSO ₄ , nachfolgende Oxydation mit 1 g Pmg.				20,86 %	- 7,37	
- 0,5 g " " " " " 1 " "				22,28 %	- 5,95	
- 2 g " " " " " 1 " "				26,81 %	- 1,42	
				26,33 %	- 1,90	

Die Tabelle zeigt ein buntes Durcheinander ganz gut stimmender Zahlen und der größten Differenzen; wir wagen nicht, aus ihr irgend welche bindenden Schlüsse für die Technik der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl zu ziehen, glauben aber, daß man beim Kreatin mindestens 20 Minuten kochen müssen, um einigermaßen richtige Werte zu bekommen,

also noch viel länger, als nötig ist, um die Flüssigkeit zu entfärben. Wir erwähnen gerade dies hier ausdrücklich, weil allgemein geglaubt wird und wir noch kürzlich in der Literatur die Angabe¹⁾ gefunden haben, daß man mit dem Kochen aufhören dürfe, sobald die Flüssigkeit klar geworden sei. Auch der Zusatz von größeren Mengen CuSO_4 und die Oxydation mit viel Permanganat hat in unseren Fällen einen beträchtlichen Stickstoffverlust verursacht. Wir haben im Verlauf unserer weiteren Untersuchungen noch die mannigfachsten Modifikationen des Kjeldahlschen Verfahrens geprüft, eine Konstanz der Stickstoffwerte haben wir aber niemals erreicht.

Noch auffallendere Differenzen wie beim Kreatin haben wir beim Kreatinin erhalten. Hier blieb die Reaktionsflüssigkeit in den meisten Fällen von Anfang bis zu Ende der Veraschung überhaupt vollkommen klar. Das gewöhnliche Kreatinin verhält sich also bei der Veraschung nach Kjeldahl wie das Isokreatinin, bei dem Thesen (Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 1) bereits die gleiche auffällige Beobachtung gemacht hat. Auch am Isokreatinin versagt nach Thesen die Kjeldahlsche Methode. Kreatinin aus Fleisch, nach der üblichen Methode behandelt, lieferte folgende Werte:

0.1355 g	gaben	0.03976 g N	=	29.35 % N.	Ber.:	37.21,	Diff.:	— 7.86
0.1344	»	0.04130	»	= 30.96 %	»	»	»	— 6.25
0.1370	»	0.02898	»	= 21.15 %	»	»	»	— 16.06

Wir haben dann, da möglicherweise ja das Präparat nicht absolut rein war, das schwerlösliche Pikrat dargestellt und dieses nach Reduktion der Pikrinsäure mit Zink nach Kjeldahl analysiert.

0.1840 g	gaben	nach vorheriger Reduktion	0.03598 g N	=	19.56 % N	Ber.:	24.56 %
0.1314	»	»	0.02534	»	= 19.23 %	»	»

Daß trotzdem das Präparat rein war, bewies uns eine N-Bestimmung nach Dumas:

0.1400 g gaben 29.8 ccm N ($t = 14^\circ$, $p = 74.6$ cm) = 24.69 % N.

Als wir nun aus diesem reinen Kreatininpikrat Kreatinin darstellten, erhielten wir wieder:

0.1240 g gaben 0.03472 g N = 28.00 %; Diff. = — 9.21.

¹⁾ Law, J. Soc. Chem. Ind. 21, 847.

Unter Zusatz von K_2SO_4 verascht:

0.1300 g gaben 0.04228 g N = 25.83% N; Diff.: - 11.38.

Dagegen lieferte auch hier eine Stickstoffbestimmung nach Dumas einen richtigen Wert:

0.1194 g gaben 38.8 ccm N ($t = 14^\circ$, $p = 74.4$ cm) = 37.60% N; Diff.: + 0.39.

Kreatininsulfat, nach Liebigs Vorschrift aus reinem Kreatin hergestellt, zeigte genau dasselbe Verhalten:

Nach Dumas gaben: 0.1566 g: 36.0 ccm N ($t = 16^\circ$, $p = 74.2$ cm).

Also N = 26.29% N. Berechnet: N = 25.93% N.

Nach Kjeldahl gaben: 0.2178 g 0.05334 g N = 24.49% N; Diff.: - 1.44

» » » 0.2052 » 0.05124 » » = 24.97% » » - 0.96

» » » 0.1874 » 0.04592 » » = 24.51% » » - 1.42.

Beim Kreatinin wird also die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl noch viel weniger zu gebrauchen sein, wie beim Kreatin.

Daß man selbst bei solchen Substanzen, die allgemein nach Kjeldahl verascht werden, zu schwankenden Zahlen kommt, möge folgende Zusammenstellung von Analysen der Harnsäure (Kahlbaum) zeigen:

Eine C- und H-Bestimmung in dem Präparat lieferte folgende Werte:

0.1564 g gaben 0.2058 g CO_2 und 0.0370 g H_2O

Ber.: C 35.7% N 2.4%

Gef.: C 35.9% N 2.6%

Harnsäure: Theoretischer N-Wert: 33.39% verascht mit 10 ccm H_2SO_4	N %	Differenz
Ohne $CuSO_4$	33.87	+ 0.48
	33.35	+ 0.04
+ 0.03 g $CuSO_4$	34.06	+ 0.67
	33.24	- 0.15
+ 0.5 gr $CuSO_4$	34.06	+ 0.67
	33.32	- 0.07
+ 2 g $CuSO_4$	33.79	- 0.40
	32.91	- 0.48

Verascht mit 10 ccm H_2SO_4 , dann 1 g Pmgt. in 2 Portionen zugesetzt, erhitzt bis zur Farblosigkeit	N %	Differenz
Ohne Zusatz von $CuSO_4$	32.03	— 1.36
	32.38	— 1.01
+ 0.03 g $CuSO_4$	32.78	— 0.61
	32.31	— 1.08
+ 0.5 g $CuSO_4$	33.09	— 0.30
	32.58	— 0.81
	32.91	— 0.48
+ 2 g $CuSO_4$	32.02	— 1.37
	32.08	— 1.31
+ 5 g $CuSO_4$ und 0.3 $KMnO_4$	33.88	+ 0.49

Also auch hier bewirkt ein reichlicher Zusatz von Kaliumpermanganat einen bedeutenden Verlust an Stickstoff.

Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Lysin, von dem schon Henderson¹⁾ angibt, daß es sich nur schwer nach Kjeldahl veraschen lasse:

Lysinpicrat lieferte uns folgende Werte: Berechnet ist 18,67 % N.

Nach Dumas: 0,1856 g gaben 30,8 ccm N ($t = 15^\circ$, $p = 74,4$ cm) = 19,12 %;
Diff.: + 0,45.

Nach Kjeldahl: 0,2079 g gaben 0,03584 g N = 17,24 %; Diff.: — 1,43
" " 0,1634 " " 0,02660 " " = 16,28 %; Diff.: — 2,39.

Nach Hendersons Angabe unter Zusatz von Phosphorwolframsäure verascht:

0,1270 g gaben 0,01428 g N = 11,24 %; Diff.: — 7,43.

Lysindichlorid nach Kjeldahl:

0,1180 g gaben 0,01106 g N = 9,37 %; Ber.: 12,82 % N.

Eine gleichzeitige Chlorbestimmung zur Kontrolle der Reinheit des Präparates ergab folgendes:

0,1480 g gaben 0,1930 g Ag Cl
Ber.: Cl = 32,34 %; Gef.: Cl = 32,24 %.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 320.

Beim Histidin ist uns ebenfalls ein beträchtlicher Stickstoffverlust aufgefallen, als wir es nach Kjeldahl veraschten:

0.1847 g Histidindichlor. sätt.	16.4 ccm $\frac{1}{10}$ N-Oxals.	= 0.02296 g N = 12.43% N
0.1526	14.2	= 0.01988 " = 13.01% N

Das gleiche Präparat gab bei der volumetr. N-Bestimmung:

0.1775 g gaben 29.1 ccm N (t = 20°, p = 74.8 cm.). Also N = 18.57%.

Für Histidindichlorid berechnet N = 18,42 %.

Überblicken wir unsere Zahlen noch einmal, so ist das Ergebnis wenig erfreulich: die so bequeme Methode Kjeldahls hat sich beim Kreatin, Kreatinin, Lysin, Histidin, Körpern, die von hervorragender physiologischer Wichtigkeit sind, als höchst unzuverlässig erwiesen: die Reihe der Substanzen würde sich gewiß noch bei einiger Geduld vermehren lassen. Ja selbst Substanzen wie die Harnsäure, die leicht und vollständig ihren Stickstoff als Ammoniak abgeben, liefern schwankende Zahlen, sobald man nicht das Optimum der Bedingungen genau einhält. Daß man auch bei den von uns untersuchten Substanzen unter bestimmten Bedingungen einmal richtige Werte wird erlangen können, wollen wir nicht bestreiten, es müßte nur eben erst für jeden einzelnen Körper im reinen Zustande dieses Optimum ermittelt werden. Wenn man aber solche Vorarbeiten nötig hat, wird die Methode ungeeignet, uns rasch über quantitative Verhältnisse einzelner bestimmter Körper in Flüssigkeiten und Niederschlägen Aufschluß zu geben. Die Methode, einen Niederschlag zu erzeugen und nun aus dem Stickstoffgehalt dieses Niederschlages nach Kjeldahl die Menge eines gesuchten Körpers zu berechnen, scheint uns nach unseren Resultaten nicht immer so ganz einwandfrei zu sein. Wir begreifen jetzt, daß die Methode Kjeldahls noch immer nicht in chemischen Laboratorien in großem Maßstabe angewandt wird, so daß z. B. noch Gattermann in seiner ausgezeichneten Praxis des organischen Chemikers¹⁾ schreibt: «Die in wissenschaftlichen Laboratorien zur quantitativen Bestimmung des Stickstoffs fast ausschließlich angewandte Methode ist die von Dumas».

¹⁾ 5. Auflage, Leipzig, Veit & Co., 1902, Seite 81.

Über die Form, in der der Stickstoff in Verlust geht, haben wir gelegentlich einige Versuche gemacht, sind damit aber noch nicht zu einem entscheidenden Resultat gekommen. Analog der Entstehung der Blausäure bei der Oxydation des Lysins¹⁾ mittels Baryumpermanganat dachten wir ebenfalls bei der Veraschung mit Schwefelsäure an das Auftreten von Blausäure, es ist uns aber bisher nicht gelungen, sie einwandfrei nachzuweisen; andererseits könnte man mit Andrlík²⁾ an die Entstehung von Aminen denken, die nur ganz langsam, zum Teil gar nicht durch das Kochen mit Schwefelsäure verändert werden.

1) Zickgraf, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 3401. In der Tat liefern auch nach unsern Versuchen Kreatin, Kreatinin und nach Herzog³⁾ das Histidin bei der Oxydation mit Baryumpermanganat Blausäure.

2) Andrlík, Zeitschr. f. Zuckerind. Böhm., Bd. 26, 667.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXXVII, S. 248.