

Zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

Von

Dr. Hans Malfatti.

(Der Redaktion zugegangen am 22. August 1903.)

In jüngster Zeit haben Fr. Kutscher und H. Steudel (Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XXXIII, S. 12) die Anwendbarkeit der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl für physiologische Zwecke stark zweifelhaft gemacht, indem sie bei einer Reihe von Körpern, in erster Linie bei Kreatin und Kreatinin, unter Anwendung der genannten Methode um ein Bedeutendes zu geringe Stickstoffwerte fanden. Dieses für alle physiologischen Chemiker unerwartete und unerfreuliche Forschungsergebnis war für mich um so auffallender, als ich schon zu wiederholten Malen Kreatinin und speziell Kreatininchlorzink nach Kjeldahl bestimmt hatte, ohne andere als die zu erwartenden Werte zu erhalten. Auch Adalbert Gregor hat in seinen gleichsinnigen, im hiesigen Laboratorium angestellten Untersuchungen (Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XXXI, S. 103) dasselbe Resultat gewonnen.

Kutscher und Steudel geben selbst an, daß wohl unter bestimmten Versuchsbedingungen auch richtige Werte des Kjeldahlstickstoffs erhalten werden könnten; somit mußte auch zur Aufklärung des hier vorliegenden Widerspruchs an den Einfluß der Methode gedacht werden.

Im Verkehr mit physiologischen Chemikern kann man die Erfahrung machen, daß fast ein jeder sich seine eigene Methode der Kjeldahl oxydation zurechtgemacht hat, die er mehr oder weniger energisch als die beste bezeichnet; die Methode also, die ich mir schon, seit ich solche Bestimmungen mache, auswählte, ist die folgende: Die Substanz wird im Kjeldahl-

kolben, gewöhnlich ohne Zusatz von Kupfersulfat oder Quecksilber, mit etwas weniger Schwefelsäure, als gewöhnlich vorgeschrieben wird, verkocht, bis sie sich in eine ruhig siedende braune Flüssigkeit verwandelt hat. Dann läßt man den Kolben erkalten und fügt eine ausreichende Menge wässriger Lösung von Kaliumpermanganat zu und erhitzt wiederum bis zur vollständigen Vertreibung des Wassers und voller Entfärbung.

Man kann also diese Durchführungsart der Kjeldahlbestimmung verantwortlich machen für das Gelingen der Stickstoffbestimmungen beim Kreatinin; ich mußte aber im vorliegenden Falle auch an den Umstand denken, daß ich, soweit ich mich erinnere, sowohl das Kreatininchlorzink als auch das Pikrat stets samt dem Filter verarbeitet hatte. Die Beimengung eines leicht oxydablen Stoffes, wie Filtrirpapier oder Watte, konnte ja die Energie der Oxydation beeinflussen, vielleicht auch die Bildung eines flüchtigen stickstoffhaltigen Körpers verhindern haben. Diesem Gedanken entsprechend, wurden einige aufklärende Versuche unternommen.

Als Versuchsobjekt diente ein aus Harn dargestelltes Kreatinin, das infolge einer Kreatinbeimischung einen Stickstoffgehalt von durchschnittlich 32% zeigte. Um sicher vergleichbare Zahlen zu erhalten, wurde dasselbe zu den Versuchen als wässrige 1%ige Lösung angewandt. Diese Lösung zeigte nach Dumas 32,0—32,1—32,14% Stickstoff. Wurden nun (gewöhnlich) je 10 ccm dieser Lösung nach Kjeldahl mit Schwefelsäure mit oder ohne Zusatz von Kupfersulfat verbrannt, wobei keine Färbung der Flüssigkeit auftrat, und dann nach dem Abkühlen mit gepulvertem Kaliumpermanganat oxydiert, so ergaben sich die Werte: 27,8—28,9—30,33 bis 31,8—31,9%. Die letzte dieser Stickstoffzahlen wurde erhalten in einem Versuch, bei welchem nur eine minimale Menge Permanganat zugesetzt worden war, der Wert 31,8% bei Verlängerung der Kochzeit auf fast eine Stunde ohne Kupfersulfat. Bei Oxydation mit Kupfersulfat allein ohne Permanganat wurden 30,25% gefunden; bei Anwendung von metallischem Quecksilber jedoch die richtigen Werte 32,0 und 32,3%.

Es wurde nun die Kreatininlösung in den Kolben mit

einem Stück asche- und stickstofffreien Filtrierpapiers oder mit etwas Zucker versetzt und mit kleinen belanglosen Modifikationen nach der von mir oben beschriebenen Durchführungsart der Kjeldahlbestimmung verbrannt: es ergaben sich in 10 Versuchen Werte, die zwischen 31,9 und 32,4% schwankten. Das heißt, die gewonnenen Prozentzahlen waren innerhalb der Fehlergrenzen richtig: woher es kommt, daß einige Zahlen höher liegen als die nach Dumas gefundenen, während man im allgemeinen das Gegenteil erwarten sollte, ist mir unerklärlich.

Irregeleitet durch einige Vorversuche, in welchen trockenes mit Filtrierpapier kjeldahlisiertes Kreatinin höhere Stickstoffwerte ergeben hatte, als ohne diesen Zusatz, hatte ich anfänglich geglaubt, der Beimengung stickstofffreier organischer Substanz den richtigen Ausfall der Bestimmungen zuschreiben zu sollen (daher die größere Anzahl der diesbezüglichen Versuche). Es stellte sich aber heraus, daß das nicht der Fall war, denn als ich die obenerwähnte Kreatininlösung unter Zusatz von Filtrierpapier kjeldahlisierte und dann mit Permanganatpulver oxydierte, ergaben sich die fehlerhaften Werte 30,8 und 31,2% und andererseits wurden beim Zerstören der Substanz ohne einen Zusatz, jedoch unter nachträglichem Oxydieren mit Permanganatlösung die richtigen Werte 31,9—32,0—32,2—32,2% gefunden.

Daraus ergibt sich, daß nur die Verwendung der wässerigen Lösung von Permanganat an Stelle des festen Salzes den richtigen Ausfall der Stickstoffbestimmungen beim Kreatinin bedingen. Wie läßt sich das nun erklären?

Die Oxydation im Kjeldahlkolben stellt sich als ein ziemlich komplizierter Vorgang dar. Während einerseits die C-, H-, S- und P-Atome einer Verbindung mit Sauerstoff anheimfallen, muß an das N-Atom, den besonderen Verhältnissen bei demselben entsprechend, Wasserstoff angelagert werden. Dieser Wasserstoff stammt in der Regel aus dem Wasser, welches sich bei der Oxydation der Substanz oder bei der Dissociation der entstehenden schwefligen Säure bildet. Dieses Wasser kann aber trotz des überhitzten Zustandes, in welchem es sich im Momente seines Entstehens befindet, nur dann Wasserstoff zur

Ammoniakbildung abgeben, wenn dem Sauerstoff ein genügend stark reduzierender Körper zur Verfügung steht, um die Spaltung des Wassermoleküls zu ermöglichen. Bei sehr stickstoffreichen, aber kohlen- und wasserstoffarmen, auch bei sehr schwer oxydierbaren Atomkomplexen kann aber sehr leicht der Fall eintreten, daß die letzteren Bedingungen nicht mehr erfüllt sind, und dann muß entweder das Molekül doch zerfallen und freier Stickstoff entweichen, oder aber, was das Wahrscheinlichere ist, die Reaktion verlangsamt sich oder hört ganz auf, so daß stickstoffhaltige Atomkomplexe übrig bleiben, die nicht Ammoniak sind. Man versuche nur, die Reaktion zwischen Guanidin und Schwefelsäure im Formelbilde darzustellen, um die genannten Möglichkeiten ersichtlich zu machen.

Gerade das Übrigbleiben von Stickstoff in nicht ammoniakartiger Bindung macht es bei Durchführung der Kjeldahlbestimmung notwendig, zum Schluß noch mit Hilfe eines kräftigen Oxydationsmittels auch diese letzten Komplexe zu zerspalten. Wenn aber diese Spaltung und Oxydation erzwungen wird, ohne daß gleichzeitig das zur Ammoniakbildung nötige Wasser zugeführt wird, so ist es leicht möglich, daß in gewissen Fällen ganz bedeutende Stickstoffverluste eintreten. Gerade beim Kreatin und Kreatinin, wo die verbleibenden Reste wohl wahrscheinlich guanidinartig sind, ist Verlust durch Bildung von freiem Stickstoff zu erwarten.

Ähnliche Erwägungen waren es, welche mich schon bei meinen ersten Kjeldahlbestimmungen, die ich an Körpern der Harnsäuregruppe ausführte, bewogen, die Oxydation mit wässriger Lösung von Permanganat auszuführen. In den eben angeführten Versuchen haben sich diese Erwägungen als richtig erwiesen.

Sehr deutlich kann man den schädigenden Einfluß der Oxydation ohne Anwesenheit von Wasser beobachten, wenn man trockenes Permanganat im Kjeldahlkolben in konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte auflöst und in die grüne Flüssigkeit gewogene Mengen einer sehr stickstoffreichen Substanz einträgt und dann die Kjeldahlbestimmung wie gewöhnlich durchführt. Kreatinin und Guanidin (das im übrigen den früher beschriebenen Versuchen gegenüber sich genau so verhält wie

Kreatinin) verloren so fast die Hälfte ihres Stickstoffs, und selbst der Harnstoff, der sonst so leicht Ammoniak liefert, verlor bei dieser Behandlung ein Viertel seines Stickstoffgehaltes.

Umgekehrt aber zeigte sich, daß während der Reaktion im Kochkolben entstehendes Wasser die vollkommene Oxydation des Stickstoffs zu Ammoniak wenigstens dem Kreatinin gegenüber begünstigte; so ergab, wie schon erwähnt, die Oxydation mit metallischem Quecksilber auch ohne Anwendung von Permanganat richtige, die mit Kupfersulfat aber zu niedrige Werte. Als ich in einem Falle am Schlusse der Schwefelsäurebehandlung in die siedende Flüssigkeit statt eines Oxydationsmittels Krystalle von Magnesiumsulfat in kleinen Portionen eintrug, ergab sich 32,0% Stickstoff, und als ich die Bestimmung ohne Oxydationsmittel, aber unter Zusatz von reinen Schwefelkrystallen, welche dabei zu schwefliger Säure verbrannten, durchführte, ebenfalls 32,0%, hingegen lieferte der Zusatz von Zucker oder Papier ohne Oxydationsmittel nur 29,6 und 30,8% Stickstoff, obwohl auch hier reichlich Wasser entstehen könnte. Doch sind bei diesen vereinzelt Versuchen zu viele Nebenumstände, z. B. Verlängerung der Siededauer, Erhöhung der Siedetemperatur usw., vorhanden, als daß man sie zu sicheren Schlüssen verwenden könnte.

Das Lysin und Histidin, für welches Kutscher und Steudel ebenfalls Stickstoffverluste bei der Kjeldahlbestimmung anführen, habe ich nicht untersucht, da ich keinen entsprechenden Vorrat von diesen Körpern besitze. Auch die Harnsäure untersuchte ich nicht, da ich von früheren Bestimmungen her weiß, daß sie richtige Werte liefert, und andererseits aus den von Kutscher und Steudel angegebenen Zahlen deutlich hervorgeht, daß bedeutendere Verluste nur bei Zusatz der sehr beträchtlichen Mengen von Permanganat entstanden.

Vom Guanidincarbonat konnte ich mich überzeugen, daß es bei Oxydation mit wässriger Permanganatlösung (gleichzeitig war Filtrierpapier mit verbrannt worden) richtige Stickstoffwerte 46,3 und 46,5% (statt 46,69%) lieferte: bei Oxydation mit Kupfersulfat allein wurden 45,0% erhalten, mit Permanganat-

krystallen 33,1% und bei Eintragen der Substanz in die Lösung von Permanganat in Schwefelsäure gar nur 24,9%

Aus all dem Gesagten geht hervor, daß bei der Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl die abschließende Oxydation am besten mit wässriger Permanganatlösung durchgeführt wird, vielleicht auch mit Quecksilber, oder mit Kupfersulfat unter Anwendung langer Siedezeit, nicht aber mit festem Permanganat. Unter Anwendung der erstgenannten Modifikation werden im hiesigen Laboratorium für med. Chemie seit Jahren sehr zahlreiche Kjeldahlbestimmungen durchgeführt, und es hat sich niemals ein Grund zur Klage ergeben, besonders auch in bezug auf Übereinstimmung von Doppelanalysen.

Für die Bestimmung neu dargestellter chemischer Körper mit noch unbekanntem Eigenschaften wird die Kjeldahlsche Methode allerdings nie benützt werden dürfen: darum, und weil sie ja bekanntlich für viele Körper überhaupt nicht anwendbar ist, ist sie auch in den rein chemischen Laboratorien nicht eingebürgert worden. Für physiologische Zwecke jedoch, für welche sie jetzt hauptsächlich angewendet wird, ist ihre Verwertbarkeit durch die an und für sich sehr interessanten Mitteilungen von Kutscher und Steudel noch nicht erschüttert.