

Methodisches zur Ammoniakbestimmung in tierischen Geweben.

Von

Erich Grafe.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Juni 1906.)

In den letzten Jahren sind die Methoden für Ammoniakbestimmungen in tierischen Flüssigkeiten so vervollkommen worden, daß sie auf einfache und schnelle Weise sehr zuverlässige Resultate liefern, die nicht jedesmal von der angewandten Methode abhängen, sondern absolute Gültigkeit besitzen. Dies gilt vor allem für den Harn. Anders liegen die Verhältnisse bei den bisherigen Untersuchungen über den Ammoniakgehalt von Organen, dessen genaue Feststellung für Stoffwechseluntersuchungen von größter Bedeutung ist. Je nach der Art und Weise, wie das Ammoniak ausgetrieben wurde, änderten sich die Werte, und die Differenzen zwischen den nach verschiedenen Methoden gewonnenen Resultaten sind zum Teil sehr erheblich, ja ein und dieselbe Methode liefert in der Hand verschiedener Untersucher verschiedene Werte¹⁾.

Folin²⁾ fand z. B. mit seiner Luftstrommethode in aus Hundelebern herausgepreßtem Organbrei 6,9 mg NH₃ auf 100 ccm, während nach der Methode von Nencki und Zaleski³⁾ 23 mg als Normalwert festgestellt wurde⁴⁾. Wenn diese beiden Zahlen sich auch nicht so genau, wie Folin es tut, miteinander vergleichen lassen, da 100 ccm ausgepreßter Leberbrei und 100 g

¹⁾ Vgl. Biedl und Winterberg, Pflügers Archiv, Bd. LXXXIII, S. 140.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 166.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193.

⁴⁾ Horodynski, Salaskin u. Zaleski, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 246.

fein zerkleinerte Lebersubstanz nicht ein und dasselbe sind, so ist doch der gewaltige Unterschied in den Resultaten mit Sicherheit daraus zu entnehmen.

Übrigens ist der oben angeführte Wert von Folin meines Wissens die einzige Mitteilung, die dieser Autor über die Anwendung seiner Methode auf Organe in der Literatur gemacht hat. Tatsächlich möchte ich es auch für sehr zweifelhaft halten, ob es gelingt, aus einer festen Substanz mit einem Luftstrom alles Ammoniak auszutreiben. Bei der Leber, die sich verhältnismäßig gut zu einem Brei pressen läßt, mag es noch allenfalls gehn, für andere Organe, bei denen dies gar nicht oder nur auf sehr umständliche Weise möglich ist, wird die Methode wahrscheinlich ganz versagen. Abgesehen von allem anderen steht ihrer allgemeinen Einführung auch der Umstand entgegen, daß nur wenige Laboratorien über einen so starken Luftstrom, wie er hierfür erforderlich ist, verfügen. Ich habe mich daher mit dem von Folin angegebenen Verfahren nicht weiter befaßt.

Ebensowenig habe ich mit der alten Schlösingschen Methode und deren Abänderungen Versuche angestellt, da sie für den Harn wohl brauchbar ist, für Ammoniakbestimmungen in Organen sich aber als ganz untauglich erwiesen hat¹⁾.

Die Methode, die sich für Ammoniakbestimmungen in zersetzlichen organischen Substanzen am meisten bewährt, ist die Destillation im Vakuum. Zuerst von Boussignault²⁾, später unabhängig von diesem von Wurster³⁾ angegeben, ist sie von Nencki⁴⁾ und seinen Schülern vervollkommenet und ausgebildet worden und hat schließlich durch Krüger und Reich⁵⁾ eine vor allem für Bestimmungen im Harn geeignete einfache Form erhalten.

Die Hauptschwierigkeit war die Wahl eines geeigneten

¹⁾ Vgl. z. B. Nencki und Zaleski, *Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie*, Bd. XXXVI, S. 385.

²⁾ *Memoires de chimie agricole*, S. 291; *Annales de chimie et de physique*, Bd. XXIX, S. 479, zitiert nach Folin a. a. O.

³⁾ *Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft von 1889*, S. 1903.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 163.

Mittels, das alles Ammoniak in Freiheit setzt, aber nur so weit, als es tatsächlich von Anfang an in dem zu untersuchenden Stoffe vorhanden ist. Für den Harn und andere tierische Flüssigkeiten, zum Teil vielleicht auch für das Blut, sind diese Hindernisse beseitigt, und es führen hier die verschiedensten Wege zum gleichen Ziel. Für die Organe läßt sich das nicht behaupten. Die Gründe für die großen Schwierigkeiten, mit denen Ammoniakbestimmungen hier zu kämpfen haben, liegen auf der Hand. Einmal ist aus einer Lösung ein Stoff viel leichter vollständig auszutreiben wie aus einem Organbrei, dessen Herstellung allein manchmal schon sehr umständlich ist; zweitens befinden sich in den Geweben frisch getöteter Tiere viele labile Stoffe, die leicht Ammoniak abspalten, was natürlich unbedingt vermieden werden soll.

Nach dem Vorgang von Schlösing benutzten Nencki und Zaleski¹⁾ zunächst Kalkmilch, bzw. Kalkwasser. Später²⁾ überzeugten sie sich im Anschluß an eine Mitteilung von Biedl und Winterberg, daß «die entwickelte Ammoniakmenge direkt im Verhältnis zu der Menge des zugesetzten Kalkwassers steht», daß also eine Zersetzung hervorgerufen wird. Während Biedl und Winterberg in ihren Arbeiten³⁾ weiter Kalkmilch in genau ausprobierten Mengen verwandten, nahmen die Petersburger Forscher von nun an eine 2%ige Emulsion von MgO als Zusatz⁴⁾, nachdem sie gefunden hatten, daß hier ein Überschuß keinen sehr großen Unterschied macht. Nach dieser Methode sind dann alle die folgenden zahlreichen Ammoniakbestimmungen im Petersburger Laboratorium ausgeführt worden.

Während die Kontrollproben, die Nencki und Zaleski mit der Magnesiaemulsion beim Blut anstellten, gute Übereinstimmungen ergaben, z. B. 1,81, 1,85 und 1,91 mg NH₃ auf je 100 ccm desselben Blutes, zeigten sich bei den Bestimmungen in Organen sehr große Differenzen. Mit Recht sahen die beiden

¹⁾ Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXVI, S. 385.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193.

³⁾ Vgl. z. B. Pflügers Archiv, Bd. LXXXIII, S. 140.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193.

russischen Forscher die Ursache dafür «in dem nicht vollständigen Eindringen der Magnesia in das zerkleinerte Gewebe» und suchten diese sehr erhebliche Fehlerquelle (bis zu 4 ccm $\frac{1}{20}$ -Normal-lauge auf 100 g Substanz Unterschied zwischen 2 Parallelbestimmungen) dadurch auszuschalten, daß sie in der Zerkleinerung der Gewebe noch weiter gingen. Sie erhielten jedoch auch so immer noch einen Unterschied von 1—2 ccm $\frac{1}{20}$ -Normal-kalilauge, d. h. 0,852—1,704 mg NH_3 auf 50 g Gewebe. Diese Differenz ist sehr erheblich. Der mittlere Fehler¹⁾ würde sich danach für den in der Arbeit von Horodynski, Salaskin und Zaleski²⁾ angegebenen Mittelwert von 23,27 mg pro 100 g Leber-substanz normaler Hunde zu 3,66—7,32% für den entsprechenden Mittelwert für die Muskulatur von 12,94 mg zu 6,58—13,16% berechnen. Bei den in einer Tabelle der eben erwähnten Arbeit aus dem Petersburger Laboratorium mitgeteilten Parallelbestimmungen beträgt er für die Leber 4,42%, für die Muskeln 6,43%, in einem Falle erreichte er sogar die Höhe von 9,65%. Angesichts solcher Zahlen kann ich nicht recht verstehen, wie die zuletzt genannten Autoren der von ihnen angewandten Methode nachrühmen können, daß sie «nicht nur über den relativen, sondern auch über den absoluten Ammoniakgehalt Aufschluß» gibt.

Folin³⁾ fand bei der Nachprüfung der Nenckischen Methode bei der Nachdestillation des Blutes noch neue beträchtliche Ammoniakmengen, sodaß man an eine sekundäre Abspaltung aus Substanzen, in denen es nicht vorgebildet war, denken muß⁴⁾. Auch aus theoretischen Erwägungen heraus hat er starke Bedenken gegen die absolute Zuverlässigkeit der Methode.

Angesichts dieser Tatsachen erscheint der Versuch, ein Verfahren auszuarbeiten, das auf einfache Weise genauere Resultate liefert, wohl berechtigt.

1) Unter dem mittleren Fehler von 2 oder mehreren Parallelbestimmungen verstehe ich hier in Übereinstimmung mit Nencki und Zaleski (Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXVI, S. 389) die Differenz zwischen den Einzelwerten und dem arithmetischen Mittel aus ihnen, bezogen auf 100 mg NH_3 .

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 249.

3) l. c.

4) Ähnliches gibt auch Hart (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 354) an.

Es handelt sich darum, ein Mittel zu finden, das alles Ammoniak austreibt, aber keine Zersetzung hervorruft. Um ein völliges Eindringen in den Gewebebrei zu ermöglichen und so den einen Hauptfehler der Destillation mit MgO zu vermeiden, konnte nur eine in Wasser leicht lösliche Substanz genommen werden. Nur einmal habe ich es auf die Empfehlung von Hart¹⁾ hin mit einem in Wasser unlöslichen Salz, dem $BaCO_3$, versucht, mußte aber wegen der abnorm niedrigen Werte, die ich erhielt, sogleich von seiner Anwendung Abstand nehmen.

Bei der Durchsicht der Mitteilungen über die bisher schon von den verschiedensten Autoren für diesen Zweck benutzten Substanzen erschien die Anwendung des zuerst von Folin empfohlenen $Na_2CO_3 + NaCl$ am aussichtsreichsten, denn es enthält, wie Folin mit Recht betont, keine Hydroxyionen, auf deren Wirksamkeit die Zersetzung organischer Körper beruht. Er wandte es bei seinem Luftstromverfahren an. Später benutzte es Schittenhelm²⁾ zum erstenmal für die Vakuumdestillation des Ammoniaks und zwar bei Faeces und tierischen Flüssigkeiten. Er erhielt damit sehr gute Resultate. Vor allem schien hier eine sekundäre Zersetzung, die er in den Faeces bei Anwendung von Kalkmilch bekam, ausgeschlossen.

Einer gütigen Anregung von Herrn Professor Thierfelder folgend, ging ich nun daran, die Anwendbarkeit des Vakuumverfahrens unter Benutzung von Soda und Kochsalz auf Organe zu prüfen.

Den Destillationsapparat, mit dem ich die im folgenden mitgeteilten Versuche anstellte, setzte ich in der Hauptsache in der vereinfachten Form, wie sie von Krüger und Reich³⁾ für Bestimmungen des Ammoniaks im Harn angegeben wurde, zusammen. Der Kürze halber verweise ich bezüglich der näheren Beschreibung auf diese Arbeit. Um den Apparat auch für meine Zwecke, d. h. vor allem für eine längere Versuchsdauer brauchbar zu machen, mußte ich einige unwesentliche Veränderungen daran vornehmen. Da mir viel darauf ankam, zur Prüfung der Methode

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 353.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 73.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 165. Die erste Mitteilung darüber erfolgte in der Dissertation von Reich, Breslau, 1902.

Parallelbestimmungen unter gleichen Bedingungen anzustellen, baute ich 2 oder 3 Apparate nebeneinander auf und schloß sie an dieselbe Wasserstrahlluftpumpe an. Bei gut schließenden Hähnen und Stopfen, die am besten mit neutral reagierendem flüssigen Paraffin abgedichtet werden, gelingt es ohne weiteres, in den 3 Apparaten ein Vakuum von durchschnittlich 20 mm Hg zu erreichen. Die Peligotschen Röhren, die ich verwandte, hatten eine Höhe von 26 cm und faßten bis zum Oberrand der beiden oberen Kugeln ca. 450 ccm Flüssigkeit. Außerdem empfiehlt es sich, sie schräg aufzustellen, und zwar so, daß die der Wasserstrahlpumpe zugekehrte Hälfte erhöht ist. So vermeidet man am besten bei sehr lebhafter Destillation ein zu starkes Hinaufschäumen in diesen Schenkel und eine Berührung der Flüssigkeit mit dem Gummistopfen, der unter Umständen eine Spur alkalischer Reaktion zeigen kann. Den Quetschhahn q_2 ersetzte ich durch einen Schraubenquetschhahn, q_1 durch einen Scheidetrichter, wie ihn auch Nencki und Zaleski an ihrem Apparat angebracht hatten.

Die 3 Peligotschen Röhren werden in einen großen Topf gestellt, der mit Eis oder mit einer Kältemischung gefüllt wird. Die Destillationsrundkolben, zu denen sich am besten 1 oder 2 l fassende Kolben aus Jenaer Glas mit sehr langem Hals eignen, werden in eine große Wanne mit Wasser gesetzt. Es ist deshalb zweckmäßig, möglichst viel Wasser zu nehmen, weil so die Temperatur sich leichter konstant erhalten läßt, und man dann den ganzen Apparat stundenlang sich selbst überlassen kann.

Will man Kontrollproben bei verschiedener Temperatur unter sonst gleichen Bedingungen anstellen, so wird ein Kolben für sich in ein zweites Wasserbad gesetzt.

Meine Versuche begann ich mit der Prüfung der Leistungsfähigkeit von Soda und Kochsalz für die Austreibung des Ammoniaks aus einer bekannten Menge eines Ammoniumsalzes. Für die Luftstrommethode war sie schon von Folin¹⁾ festgestellt.

Ich fand, daß aus einer Lösung von bekanntem Gehalt an NH_4Cl alles Ammoniak bei Zusatz von Soda und Kochsalz

¹⁾ l. c.

im Vakuum ausgetrieben, und daß aus zugesetztem Witte-Pepton oder Hühnereiweiß kein Ammoniak abgespalten wird.

Zum Beleg mag folgender Versuch mitgeteilt werden, in dem ganz besonders große Mengen Alkali genommen waren.

0,2173 g NH_4Cl wurden destilliert mit 100 ccm konzentrierter Sodalösung + 100 ccm konzentrierter Kochsalzlösung + 75 ccm 96%igem Alkohol + 25 ccm einer 10%igen Lösung von Hühnereiweiß. Die Temperatur betrug 37° . Das Ergebnis war folgendes:

Dauer der Destillation	Menge $n/10\text{-NH}_3$ in ccm	Gesamtgehalt an NH_3 in %
Nach 3 Stunden	40,3	99,19
» 4 »	0,2	0,49
» 5 »	0,05	0,14
» 6 »	0,00	0,00
Nach 6 Stunden	Summa 40,55 ccm = 69,10 mg NH_3	99,82

Es enthalten 0,2173 g NH_4Cl 69,24 mg NH_3

Differenz = - 0,12 » »

Gefunden wurden also 99,82% der vorhandenen Menge.

Dies Ergebnis beweist zur Genüge, daß auch bei stärkster Konzentration des angewandten Alkalis keine Spur von Zersetzung des Eiweißes bei 37° eintritt. Allerdings ist, um alles Ammoniak zu erhalten, eine Destillationsdauer von 4—5 Stunden notwendig.

Durch vielfache Variationen der einzelnen maßgebenden Faktoren, der Temperatur sowie der Art und Menge des Zusatzes, versuchte ich dann weiter die günstigsten Verhältnisse für eine möglichst schnelle und vollkommene Austreibung des Ammoniaks herauszubekommen.

Als das Zweckmäßigste ergab sich mir schließlich der Zusatz von 50 ccm kaltgesättigter Sodalösung, 100 ccm kaltgesättigter Kochsalzlösung und 100 ccm Aqua destillata zu ca. 50 g Organsubstanz und die Anwendung einer Temperatur von höchstens $37\text{—}38^\circ$. In den meisten Fällen kommt man auch

mit einem Zusatz von nur 25 ccm Sodalösung aus (vgl. z. B. die Ammoniakbestimmung in der Leber auf S. 309). Jedoch geht man, besonders wenn es sich um schwer zu zerkleinernde Organe handelt, sicherer, wenn man die doppelte Menge nimmt.

Im einzelnen gestaltet sich die Methode dann folgendermaßen:

Die Organe werden unmittelbar nach dem Tode des Tieres, das man möglichst ausbluten läßt, entnommen und sofort verarbeitet. Bei der Leber ist das unbedingt notwendig, andere weniger leicht zersetzliche Gewebe kann man nach dem Vorgange von Nencki und Zaleski¹⁾ mit Salicylsäure bestreuen und 24 Stunden ohne nachweisbaren Fehler auf Eis aufheben.

Nachdem die Organe von Häuten und größeren Gefäßen befreit sind, werden sie durch eine sehr feine Fleischhackmaschine oder, wo es wie bei der Leber geht, am besten durch ein Sieb zerrieben und zerkleinert.

Man nimmt dann 2 oder 3 Proben von ca. 50 g, die auf 0,1 genau abgewogen werden, und spült jede mit 100 ccm konzentrierter Kochsalzlösung, 50 ccm Alkohol und 100 ccm Aq. destillata in den Destillationskolben. Zuletzt werden 50 ccm gesättigte Sodalösung zugefügt. Selbstverständlich muß man sich vorher davon überzeugen, daß sämtliche zugesetzte Flüssigkeiten keine Spur Ammoniak enthalten. Nachdem die Kolben dem Apparat luftdicht angeschlossen und die Peligotschen Röhren mit 10 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure und ebensoviel destilliertem Wasser beschickt sind, werden die Flammen unter dem Wasserbad angesteckt. Gleichzeitig wird evakuiert und der Topf mit den Peligotschen Röhren mit Eis oder einer Kältemischung gefüllt. Bei einem Vakuum von 20 mm Hg beginnt schon nach einer Viertelstunde, wenn das Thermometer des Wasserbades 25—28° zeigt, der Kolbeninhalt zu sieden. Es ist ratsam, in den ersten 3 Stunden nicht viel über diese Temperatur hinauszugehn, da bei höheren Graden leicht Organteile, die noch nicht ganz mit der alkalischen Flüssigkeit durchtränkt sind, an die Kolbenwand spritzen und dann unter Umständen nicht ihr ganzes Ammoniak hergeben können. Später, wenn die Temperatur auf

¹⁾ l. c.

36—37° erhöht wird, und die Flüssigkeit überall völlig eingedungen ist, fällt diese Gefahr fort. Sollte im Anfange trotz des Alkoholzusatzes, den zuerst Krüger und Reich,¹⁾ dann unabhängig von ihnen, Folin und Shaffer²⁾ empfohlen haben, Schäumen eintreten, so kann man durch Verstellen des Quetschhahns q_2 die Schnelligkeit des Evakuierens für den einzelnen Apparat regulieren. Ist einmal der Apparat in Gang gebracht und die Temperatur konstant geworden, was bei einiger Übung alles in allem 20—30 Minuten dauert, so kann man die Destillation sich selbst überlassen, nur nach etwa 3 Stunden muß man die Temperatur des Wasserbades auf 36—37° steigern. Nach 6—7 Stunden, gerechnet vom Beginne des Siedens an, ist die Ammoniak austreibung beendet, da, wie ich mich überzeugt habe, dann eine 1stündige Nachdestillation 0,00 oder höchstens noch 0,05 ccm $\frac{1}{10}$ -NH₃ ergibt. Die Abstellung des Apparats geschieht in der von Krüger und Reich angegebenen Art.

Bei der Titration des Inhaltes der Peligotschen Röhren mit $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge benutzte ich als Indikator das schon von Nencki und Zaleski empfohlene Lacmoid-Malachitgrün. Es zeigt bei so großen Flüssigkeitsmengen (200—250 ccm) von den mir bekannten Indikatoren am besten den Endpunkt der Titration an. Kochen des Destillates vor der Titrierung zur Entfernung etwa vorhandener Kohlensäure erwies sich als unnötig, da vergleichende Bestimmungen ergaben, daß bei der Titration von gekochtem und ungekochtem Destillat identische Resultate erhalten wurden. Nur bei einigen Versuchen mit Markthallenlebern zeigte sich ein Unterschied in dem Sinne, daß das gekochte Destillat 3—5% $\frac{1}{10}$ -Normallauge weniger verbrauchte. Vermutlich handelt es sich in diesen Fällen um eine durch Bakterienwirkung entstandene labile Substanz, die beim Kochen Ammoniak abspaltet. Eine ebenfalls beim Kochen ammoniakabspaltende Substanz beobachtete Folin in der Vorlage, als er Harn und Blut seinem Luftstromverfahren unterwarf.

¹⁾ l. c.

²⁾ American Journal of physiology, Bd. VIII, S. 330, 1903.

Mit der eben beschriebenen Methode habe ich besonders Lebern und Muskeln bei Kaninchen untersucht. Die ersteren Organe sind wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit gute Prüfsteine darauf, ob bei der Destillation mit Na_2CO_3 und NaCl keine sekundäre Ammoniakabspaltung eintritt; die Muskeln bieten dadurch besondere Schwierigkeiten, daß sie sich schwer sehr fein zerkleinern lassen, und infolgedessen die Gefahr besteht, daß sie nicht alles Ammoniak hergeben. Von der Untersuchung anderer Organe beim Kaninchen mußte ich absehen, weil wegen ihrer Kleinheit keine Kontrollproben möglich waren.

Zum Belege für die Leistungsfähigkeit der Methode teile ich nun aus meinen Versuchsprotokollen einige Paare von Parallelbestimmungen mit. Von den 5 bei den Lebern verschiedener Tiere vorgenommenen Destillationen setze ich das beste und das schlechteste Ergebnis hierher.

Menge	Zusatz	Druck mm Hg	Tem- pera- tur	ccm $n_{/10}$ - NH_3 nach 3 Std.	ccm $n_{/10}$ - NH_3 nach weiteren 3 Std.	ccm $n_{/10}$ - NH_3 nach 1stünd. Nach- destillat.	mg NH_3 auf 100 g Sub- stanz	Diffe- renz	Mittle- rer Fehler in %
39,1	25 ccm konz. Sodalösung + 100 ccm konz. Koch- salzlösung + 100 ccm H_2O + 50 ccm Alkohol	20	Die ersten 3 Std. 28 bis 30°, dann 35 bis 37°	1,3	0,5	0,05	8,06	0,03	0,19
37,9	Derselbe, nur statt 25 ccm Soda- lösung 50 ccm	20	»	1,25	0,5	0,05	8,09		
41,3	»	30	36 bis 38°	1,55	0,3	—	7,63	0,52	3,3
43,9	»	30	»	1,7	0,4	—	8,15		

Als Beispiele für die Ammoniakbestimmung in der Muskulatur, die ich bei 17 Tieren vornahm, seien folgende Resultate angeführt:

Menge	Zusatz	Druck mm Hg	Tem- pera- tur	ccm n_{10} -NH ₃ nach 7 Stund. Destil- lation	ccm n_{10} -NH ₃ nach 1stünd. Nach- destill.	mg NH ₃ im ganzen auf 100 g Subst.	Diffe- renz in mg NH ₃	Mittle- rer Fehler in %
59,9	50 ccm konz. Sodalösung + 100 ccm konz. Koch- salzlösung + 100 ccm H ₂ O + 50 ccm Alkohol	20	Die ersten 3 Stund. 25—28°, dann 35—37°	5,0	0,00	14,22	0,23	0,815
54,2	»	20	»	4,45	0,00	13,99		
46,88	»	20	»	4,8	—	17,45	0,20	0,58
47,42	»	20	»	4,8	—	17,25		
72,8	»	20	»	6,85	—	16,03	0,23	0,71
57,1	»	20	»	5,45	—	16,26		
61,7	»	20	»	6,1	—	16,85	0,22	0,65
63,4	»	20	»	6,35	—	17,07		

Die Milz untersuchte ich nur einmal, und zwar bei einem eben getöteten Pferd. Die Resultate der 3 Paralleldestillationen waren folgende:

Menge	Zusatz	Druck mm Hg	Tem- pera- tur	ccm $n/10$ -NH ₃ nach 7stünd. Destil- lation	ccm $n/10$ -NH ₃ nach 1stünd. Nach- destill.	mg NH ₃ im ganzen auf 100 g Subst.	Diffe- renz in mgNH ₃ vom Mittel- wert 9,55	Mittle- rer Fehler in %	Mittle- rer Fehler im Durch- schnitt
57,84	50 ccm konz. Sodalösung + 100 ccm konz. Koch- salzlösung + 100 ccm Was- ser + 50 ccm Alkohol	25	Die ersten 3 Std. 25 bis 28°, dann 36 bis 37°	3,2	0,00	9,43	- 0,12	1,26	0,94 %
48,4	»	25	»	2,75	0,00	9,68	+ 0,13	1,36	
58,12	»	25	»	3,2	0,05	9,53	- 0,02	0,21	

Auf andere Organe wie die ebengenannten habe ich die Methode nicht angewandt, aber ich bin überzeugt, daß sie auch da zu ähnlich guten und genauen Resultaten führt.

Um für alle Bestimmungen annähernd gleiche Verhältnisse zu schaffen, wurden die Tiere sämtlich nüchtern, etwa 12 Stunden nach der letzten Mahlzeit getötet. Infolgedessen erhielt ich für die Organe der 20 untersuchten Tiere Werte, die nur wenig von einander abweichen. Der Gehalt der verschiedenen Kaninchenlebern schwankte zwischen 7,63 und 9,90 mg NH₃ pro 100 g Organmenge als äußersten Werten und betrug im Mittel 8,52 mg NH₃. Die Werte, die ich für die Muskulatur erhielt, bewegten sich zwischen 13,99 und 17,46 mg NH₃ für 100 g Muskelsubstanz, das Mittel war 15,75 mg.

Um über die Exaktheit der Methode an und für sich und im Verhältnis zu anderen ein sicheres Urteil zu gewinnen, worauf es in erster Linie hier ankommt, muß man den mittleren Fehler der Parallelbestimmungen berechnen.

Dieser beträgt in meinen Versuchen für die Leber 0,87%, für die Muskeln 0,85%. Daß er im letzteren Falle trotz der großen Schwierigkeiten, die die schwer zu zerkleinernden Muskeln

der Destillation bereiten, noch etwas geringer ist wie in der Leber, hat darin seinen Grund, daß die bei der Destillationsmethode unvermeidlichen Fehlerquellen durch Auswaschen, Titrieren usw. stets dieselben bleiben, aber je nach der Menge des gefundenen Ammoniaks verschieden stark in die Erscheinung treten; je kleiner die Mengen, desto schwerer fallen die Fehler ins Gewicht. Wenn man bedenkt, daß eine Fehlerquelle allein, z. B. ein Tropfen bei der Titration zu viel oder zu wenig gebraucht, für den Mittelwert der Leber schon einen mittleren Fehler von 0,11%, für die Muskulatur von 0,06% bedingt, so wird man bei Substanzen, die nur 0,0001—0,0002% NH_3 enthalten, eine größere Genauigkeit wie die von 0,9% mittlerem Fehler der Bestimmungen untereinander kaum verlangen können.

Stellt man den eben mitgeteilten Zahlen die mittleren Fehler der nach der Nencki-Zaleskischen Methode ausgeführten Bestimmungen — andere Verfahren kommen hier nicht in Betracht — gegenüber, so ist der Unterschied in der Genauigkeit außerordentlich groß. Während der mittlere Fehler meiner Resultate bei der Leber im Durchschnitt 0,87% beträgt, erreicht er bei der im Petersburger Laboratorium geübten Methode, wie oben ausgeführt, die Höhe von 4,42%, für die Muskulatur sogar 6,43% gegenüber 0,85% mittlerem Fehler meiner Bestimmungen in diesen Organen. Die von mir beschriebene Methode ist also der bisher geübten um das 5—6fache an Genauigkeit überlegen.

Um die Destillation mit Magnesia beurteilen zu können, habe ich in vielen Fällen eine dritte Parallelprobe nach den Angaben der beiden russischen Forscher behandelt und bekam dabei für die Leber Mengen, die zwischen 9,63 und 12,30 mg NH_3 lagen, also größer waren, wie bei Anwendung von Soda und Kochsalz. Jedoch gelang es mir hier nur in einem Falle, bei der Nachdestillation, die in der siebten Stunde für die mit der Soda- und Kochsalzlösung behandelten Parallelproben 0,00 oder höchstens 0,05 ccm $\frac{1}{10}$ -Normal- NH_3 ergab, einen Wert zu erzielen, der unter 0,1 lag, sodaß ich die Angabe Folins, daß bei Anwendung von MgO immer wieder geringe, neue Mengen von Ammoniak auftreten, vollauf bestätigen kann.

Folgendes Beispiel mag das verdeutlichen, es handelt sich um zwei gleichzeitig ausgeführte Bestimmungen:

Menge (Kaninchen- leber)	Zusatz	Tem- pera- tur	Druck mm Hg	ccm n/10- NH ₃ nach 4 Std.	ccm n/10- NH ₃ nach weite- ren 3 Std.	ccm n/10- NH ₃ nach 1 std. Nach- destil- lation	mg NH ₃ pro 100 g Sub- stanz	Diffe- renz in mg
42,6 g	50 ccm konz. Soda- lösung + 100 ccm konz. Kochsalzlösung + 50 ccm H ₂ O + 50 ccm Alkohol	37°	20	1,6	0,45	0,0	8,20	4,10
38,1 g	50 ccm 2%ige MgO- Emulsion + 150 ccm H ₂ O + 50 ccm Alkohol	37°	20	2,5	0,25	0,1	12,30	

Die Hauptursache für die höheren Werte bei Anwendung von MgO ist wohl hier höchstwahrscheinlich eine sekundäre Ammoniakabspaltung aus den sehr labilen, N-haltigen Verbindungen der Leber. Da solche Zersetzungen aber unkontrollierbar sind, ist es nicht zu verwundern, wenn dann die Unterschiede zwischen den Kontrollproben so groß ausfallen.

Vergleichsbestimmungen mit der Magnesiaemulsion in der Muskulatur ergaben einen sehr unregelmäßigen Gehalt an Ammoniak, meist einen niedrigeren wie bei Anwendung von Soda und Kochsalz. Die äußersten Grenzen lagen bei 10,28 und 17,68 mg NH₃, der Mittelwert bei 14,01. Auch hier entwickelte die Nachdestillation manchmal noch Spuren von Ammoniak, wo in den Parallelbestimmungen mit der Soda-Kochsalzlösung keins mehr nachweisbar war. Der Grund für die unregelmäßigen und abgesehen von dem einen Wert von 17,68 stets niedrigeren Zahlen und die großen Differenzen zwischen den Parallelbestimmungen ist, wie Nencki und Zaleski schon selbst vermuteten, wohl hauptsächlich das ungleiche und oft unvollständige Eindringen der Magnesiaemulsion in die Muskelteilchen. Werden Partikel bei Beginn der Destillation über das Niveau der Flüssigkeit hinausgeschleudert, was sich oft nicht vermeiden läßt, und bleiben sie dann an der Wand des Kolbens kleben, so

trocknen sie dort sehr schnell ein und sind bedeckt mit einer Kruste von MgO. Ihr Ammoniak entzieht sich natürlich der Bestimmung. Ich habe diese Beobachtung wiederholt gemacht.

Angesichts dieser großen Ungenauigkeit bei der Destillation mit Magnesia ist man wohl berechtigt, dieser Methode die Fähigkeit, absolute Werte für den Ammoniakgehalt in Organen zu liefern, wie Horodynski, Salaskin und Zaleski sie ihr zutrauen, abzuspochen. Inwieweit dadurch die relative Gültigkeit der mit ihr gewonnenen Resultate berührt wird, vermag ich nicht zu entscheiden.

Jedenfalls aber erscheint es nicht aussichtslos, mit der vorher mitgeteilten, außerordentlich einfachen und exakten Methode noch einmal nachzuprüfen, ob die mit den früheren weniger genauen Verfahren gewonnenen Anschauungen über manche wichtige Frage des Stoffwechsels zu Recht bestehen.

Zum Schluß erlaube ich mir, meinem hochverehrten Abteilungschef, Herrn Professor Thierfelder, für die gütige Anregung zur vorliegenden Arbeit und die mir gewährte freundliche Unterstützung bei ihrer Ausführung aufrichtigen Dank zu sagen.
