

Mikrokjeldahlmethode.

Von

Emil Abderhalden und Andor Fodor.

Mit 4 Abbildungen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)
(Der Redaktion zugegangen am 14. November 1916.)

Der Meister der mikroanalytischen Elementaranalyse Fritz Pregl, von dessen sorgsamem Studien über Mikromethoden alle Forschungen auf dem Gebiete der Chemie großen Nutzen ziehen und noch in vermehrtem Maße in Zukunft ziehen werden, hat auch eine Mikrokjeldahlmethode angegeben¹⁾. Sie ist in der zuerst beschriebenen Form etwas umständlich. Auch die von Ivar Bang²⁾ empfohlene Mikrokjeldahlmethode ist nicht einfach. Wir haben seit drei Jahren eine solche Methode in Gebrauch, die ein ziemlich getreues Abbild der Makrokjeldahlmethode darstellt und, wie diese, sehr einfach zu handhaben ist. Die erhaltenen Resultate sind gute. Die Methode ist bereits im Jahre 1914 von uns kurz mitgeteilt worden³⁾. Da sie nur dann zuverlässige Resultate ergibt, wenn die Vorschriften genau inne gehalten werden, sei die Methode, nachdem sie sich immer wieder bewährt hat, hier etwas ausführlicher mitgeteilt.

Vorbereitung der Substanz.

Die Vorbereitung der Substanz zur Analyse erfolgt mit Hilfe der gebräuchlichen Methoden der analytischen Chemie.

¹⁾ Fritz Pregl, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. V, S. 1344, 1912.

²⁾ Ivar Bang, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile, S. 6. Bergmann, Wiesbaden 1916.

³⁾ Emil Abderhalden und Andor Fodor, Münchener mediz. Wschr. Bd. 61, S. 765 (1914). Vgl. auch Emil Abderhalden, Abwehrfermente. 4. Auflage, S. 301.

Steht nur ganz wenig Substanz zur Verfügung, so wird man das Konstantwiegen selbstverständlich auf einer Mikrowage ausführen. Man setzt das Trocknungsverfahren so lange fort, bis die Gewichts­differenz zweier unmittelbar auf einander folgender Wägungen höchstens 2‰ beträgt. Mit großem Vorteil verwendet man den im hiesigen Institute eingebürgerten Vakuumtrockenapparat (nach Emil Fischer) unter Erhitzen im konstanten Dampfbad, wobei man die zu verdampfende Flüssigkeit je nach der gewünschten (und von der Substanz auch ertragenen) Temperatur wählt.

Steht mehr Substanz zur Verfügung, etwa hinreichend für Doppelbestimmungen oder noch mehr Kontrollen, so wird man eine größere Substanzmenge auf einer gewöhnlichen analytischen Wage abwiegen, in einer bestimmten Flüssigkeitsmenge auflösen und für jede Bestimmung einen aliquoten Teil der Lösung entnehmen.

Was die abzuwiegenden Mengen betrifft, so sind diesen durch den Bau und die Dimensionen der unten abgebildeten Apparatur bestimmte Schranken gesetzt. Im allgemeinen kann man ohne Schaden für die Bequemlichkeit der Methode höchstens 10 bis 20 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Schwefelsäure in die Vorlage V (Fig. 1) bringen. Diese Menge bindet 1,4 bis 2,8 mg Stickstoff. Die abzuwiegende Substanzmenge wird man somit je nach ihrem Stickstoffgehalt nach diesen Zahlen zu richten haben.

Gelangen Harn, Serum und andere Körperflüssigkeiten zur Untersuchung, so ergeben sich die abzumessenden aliquoten Mengen durch die Erfahrung oder, falls keine vorliegt, durch einen besonderen Vorversuch.

Die Verbrennung der Substanz.

Liegt eine feste Analysesubstanz vor, so wird diese direkt verbrannt, nachdem vorher die zur Verbrennung nach Kjeldahl nötigen Ingredienzien hinzugefügt worden sind. Kommen dagegen aliquote Teile von Lösungen (Harn, Serum) zur Bestimmung, so müssen diese vorher eingedampft werden. Das Eindampfen wird hier sofort im Verbrennungskolben K vorgenommen. Zur Vermeidung des Stoßens infolge Siede-

verzugs wird eine kleine Messerspitze Talkum in die Flüssigkeit gebracht, welches Mittel für die meisten Fälle ausreichend ist. Sollte dies aber nicht genügen, so hilft man sich durch die Zugabe einiger Glasperlen. Man kann selbstredend die zur Verbrennung nötigen Reagenzien schon vor dem Verdampfen hinzufügen und wird dies auch immer tun, falls nicht besondere Umstände es verbieten. So könnte eventuell eine während des Verdampfens sich ausscheidende Substanz (Sulfate, Koagulation durch das Kupferion usw.) ein Stoßen oder Spritzen herbeiführen, in welchem Falle es geeigneter ist, die Schwefelsäure und die Salze direkt zum Trockenrückstand hinzuzufügen, immer natürlich vorausgesetzt, daß ein Verlust an Stickstoff während des Eindampfens ausgeschlossen ist.

Die zur Verbrennung angewandten Reagenzien sind die von den gewöhnlichen Kjeldahl-Analysen her bekannten: rauchende Schwefelsäure (Kahlbaums Kjeldahlschwefelsäure), Kupfersulfat als Katalysator und Kaliumsulfat zur Erhöhung der Siedetemperatur. Man nimmt für die Mikrobestimmung im allgemeinen 1 ccm der rauchenden Schwefelsäure (hat man gewöhnliche konzentrierte 96%ige Säure zur Verfügung, so nimmt man etwa 1,5 ccm). Diese Menge wird in den Verbrennungskolben K (Fig. 1), der aus Jenaglas geblasen sein muß, vorsichtig hineinpipettiert.

Ferner gelangen 5 bis 6 Tropfen einer etwa 10%igen Kupfersulfatlösung in den Kolben. Endlich fügt man noch ein Kryställchen Kalisulfat zur Mischung. Man vermeide peinlichst einen unnötigen Überschuß an den genannten Salzen, denn ein solcher verursacht bei der späteren Austreibung des Ammoniaks durch ihre Ausscheidung Verstopfungen, die ausschließlich durch Hinzufügung größerer Wassermengen zu vermeiden sind. Ein solches Verfahren aber zieht wiederum große Verdünnungen nach sich und dieser Umstand vereitelt das quantitative Austreiben des Ammoniaks und macht hierdurch die ganze Methode unbrauchbar. Aus gleichen Gründen wird man sich auch an das Minimum von Schwefelsäure halten, denn ein Überschuß an dieser würde wieder entsprechend größere Laugemengen zur Neutralisation erfordern, wodurch der gleiche

Übelstand, nämlich die Bildung großer Salzmengen, herbeigeführt wird.

Man vergesse niemals, daß diese Mikromethode, die sich auf eine Austreibung des Ammoniaks durch Luftdurchleitung bei mäßiger Temperatur stützt, nur so lange einen Wert besitzt, so lange die Bedingungen für ein quantitatives Austreiben dieses Gases auch wirklich innegehalten werden. Dieses ist bei erheblicheren Verdünnungen unmöglich.

Nunmehr bringt man den Kolben mit seinem Inhalte in einen gewöhnlichen Kjeldahl-Verbrennungsofen und erhitzt ihn mit der vollen Flamme eines Brenners. Hat man keinen solchen Ofen zur Verfügung, so nimmt man eine Eisenschale mit Sand zu Hilfe und führt die Verbrennung im Sandbade aus, indem man gleichzeitig für genügende Ableitung der Schwefelsäuredämpfe sorgt.

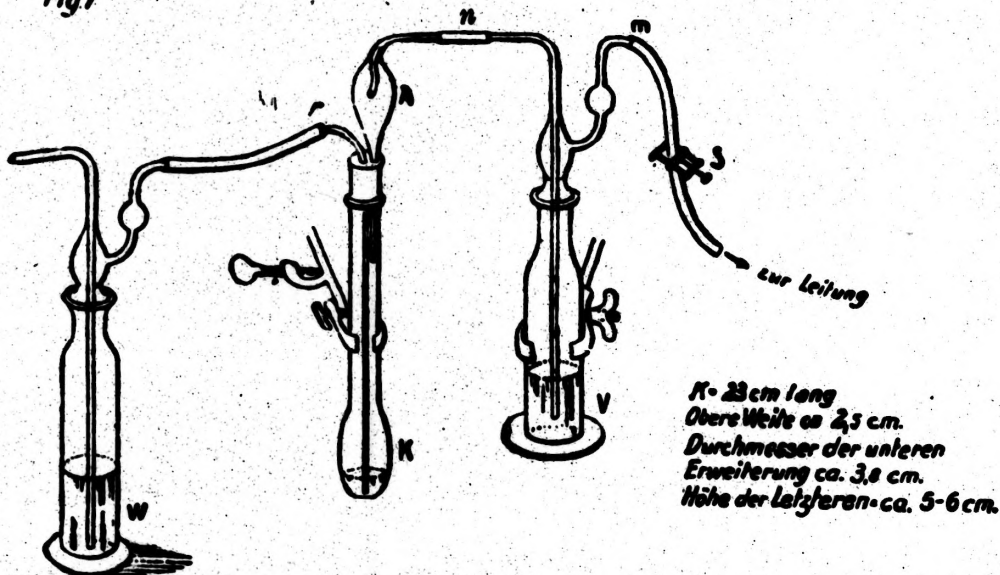
Nachdem die Substanz ganz verbrannt ist, was man an der Aufhellung der zuerst durch die Kohleausscheidung dunkel gefärbten Flüssigkeit wahrnimmt, läßt man einige Minuten erkalten, beschleunigt diesen Vorgang eventuell durch Hineinstellen des Kolbens in kaltes Wasser, und verdünnt das Reaktionsgemisch mit nicht mehr als 0,5 ccm destilliertem Wasser. Die Lösung, die eine grünlichblaue Farbe annimmt, wird hierdurch wieder heiß, so daß man vor der weiteren Operation nochmals gründlich abkühlen muß. Sodann bringt man die inzwischen vorbereitete Einlage (Stopfen aus Gummi mit einer rechtwinklig gebogenen Glasröhre und Aufsatz A, siehe Figur 1) in den Verbrennungskolben und setzt diese, wie aus Figur 1 ersichtlich, mit der gleichfalls bereit stehenden Vorlage V in Verbindung, wobei man darauf zu achten hat, daß bei n Glas an Glas gelangt. Die Vorlage V wurde vorher mit der entsprechenden Menge an $\frac{1}{100}$ -N-Säure beschickt (s. weiter unten!). Der Aufsatz A muß trocken sein. Vorhandene Feuchtigkeit würde Ammoniak zurückhalten!

Steht der Kolben K mit der Vorlage V in Verbindung, so setzt man die Wasserstrahlpumpe in Gang und saugt soviel Luft durch den Apparat, daß man jede einzelne Luftblase, die durch die Flüssigkeiten streicht, deutlich wahrnehmen

kann. Man reguliert am besten nicht mit der Pumpe selbst, sondern mit Hilfe eines Schraubenquetschhahns, den man am Schlauch S angebracht hat. Die Pumpe läßt man hierbei im vollen Gange laufen.

Während dieses regelmäßigen Luftdurchleitens wird aus einer spitz auslaufenden Pipette, die man bei r an das rechtwinklig gebogene Glasrohr hält, vorsichtig gewöhnliche 33%ige Kjeldahl-Natronlauge in den Apparat gesaugt. Man läßt die aus der Spitze der Pipette sehr langsam ausfließende Lauge an der Röhrenwand hinunterfließen und achtet darauf, daß man die Öffnung bei r mit der Pipette nicht verstopft. In diesem

Fig. 1



Falle würde im Apparate ein Vakuum entstehen, was zur Folge hätte, daß die gesamte Laugenmenge auf einmal und noch dazu ganz stürmisch in den Kolben gesaugt würde, ein Umstand, der bedeutende Störungen nach sich ziehen könnte. Sobald die ausreichende Laugemenge zugeflossen ist und die Farbe der Flüssigkeit je nach der hinzugefügten Kupfersulfatmenge in eine bläuliche bis schwarze Farbe übergegangen ist, hört man mit dem Alkalisieren auf und verbindet bei r mit der Waschflasche W, die mit verdünnter Schwefelsäure gefüllt ist und den Zweck hat, zu vermeiden, daß mit der Luft Ammoniakdämpfe aus der Atmosphäre des Laboratoriums in die Vorlage V gelangen.

Bei dieser Gelegenheit sei nachdrücklich darauf hingewiesen, daß alle zur Verbrennung gelangenden Chemikalien vorher auf Stickstofffreiheit zu prüfen sind.

Durch die erfolgte Neutralisation gewinnt die Flüssigkeit ein Volumen von 6 bis 8 ccm. Sie stellt eine ziemlich (wenigstens nach dem Erkalten) gesättigte Salzlösung dar und erlangt durch die frei gewordene Neutralisationswärme eine Temperatur von ungefähr 60 bis 70°. Unter diesen Bedingungen, zu denen man noch die Durchsaugung eines fremden Gases (Luft) hinzufügen muß, gelingt es ohne jede weitere Erhitzung leicht, das Ammoniak praktisch quantitativ überzutreiben. Es ist aber leicht einzusehen, daß man bei erheblicheren Verdünnungen alle diese günstigen Bedingungen zunichte macht: nicht allein wird das Volumen größer, was an und für sich schon ungünstig wirkt, sondern es stellt die Flüssigkeit außerdem keine gesättigte Salzlösung mehr vor, besitzt auch die zum Austreiben gerade geeignete Temperatur nicht mehr usw. Eine Unterstützung der Temperatur mit einem Brenner ist deshalb von Gefahr, weil man hierbei leicht zu weit geht, wodurch in die Vorlage heiße Wasserdämpfe gelangen, welche die darin befindliche $\frac{1}{100}$ -n-Säure auf eine höhere Temperatur erhitzen, der das Glas keinen Widerstand zu leisten vermag. Es wird in diesem Falle Alkali abgegeben, wodurch man zu viel zu hohen Stickstoffwerten gelangt. Dieser Fehler wird neben anderen Unregelmäßigkeiten durch Innehaltung der vorgeschriebenen Volumenverhältnisse vermieden. In diesem Falle genügt die Neutralisationswärme, um die Flüssigkeit auf eine ausreichend hohe Temperatur zu bringen, und man entgeht der Gefahr, die etwa überdestillierende Wasserdämpfe hervorbringen.

Herstellung und Anwendung der Titrierflüssigkeiten.

Dieser Teil der Analyse erfordert die allergrößte Sorgfalt und Vorsicht. Zur Titration solcher kleinen Ammoniakmengen, wie sie diese Methode mit sich bringt, eignen sich

ausschließlich $1/100$ -n-Titrierflüssigkeiten. Diese einzustellen ist insofern nicht einfach, als die Glasgefäße, in denen man die Titrationsen ausführt, sehr leicht Alkali abgeben. Aus diesem Grunde sind hier bestimmte Vorkehrungen zu treffen. Die gleiche Schwierigkeit ergibt sich bei der Aufbewahrung der $1/100$ -Säure und Lauge in den Standflaschen aus Glas. Will man ferner zwecks größerer Bequemlichkeit die $1/100$ -n-Flüssigkeiten durch Verdünnung einer genau eingestellten $1/10$ -normalen herstellen, so ist eine weitere Fehlerquelle in dem Umstande zu beachten, daß das destillierte Wasser des Laboratoriums beinahe niemals genau neutral ist, wenigstens nicht gegenüber dem von uns mit großem Vorteil angewandten Indikator, nämlich alizarinsulfosaurem Natrium. In diesem Falle behilft man sich in der Weise, daß man das zur Verdünnung bestimmte destillierte Wasser mit diesem Indikator färbt, indem man je nach der Reaktion des Wassers mit Säure oder Lauge auf jene Übergangsfarbe des Indikators einstellt, die bei den sonstigen Titrationsen mit dem Indikator beobachtet wird. Mit dem gleichen gefärbten Wasser ist auch die Vorlage V (Fig. 1) auszuspülen, jedesmal bevor die $1/100$ -n-Säure in sie hineingebracht wird.

Was nunmehr die Glasapparate betrifft, so sucht man sich in der Weise zu helfen, daß man vor allem möglichst gutes, d. h. widerstandsfähiges Material verwendet, mit Vorliebe solches, das bereits längere Zeit im Gebrauche stand. Sehr verwendungsfähig ist als Material für die Vorlage V sowohl als auch für Titriergefäße (für die Einstellung), ferner auch für die Aufbewahrung Geräteglas von Jena. In unseren Untersuchungen wurde die $1/100$ -n-Säure und Lauge in der oben angegebenen Weise, nämlich durch Verdünnung einer nach der Oxalatmethode eingestellten $1/10$ -n-Schwefelsäure und Natronlauge hergestellt. Die Aufbewahrung erfolgte in Standflaschen aus Jenaglas. Die angewandten Glasgefäße (nämlich jene, die mit den Titrierflüssigkeiten in Berührung kommen) wurden außerdem noch jeweils 10—15 Minuten lang gedämpft. Den hierzu nötigen Apparat zeigt Fig. 2. Er besteht aus einem Kolben für das zu verdampfende

Wasser, ferner aus dem Trichter für das Auffangen des Kondenswassers und einer Glasröhre mit Kork, welcher ziemlich lose im oberen Trichterrohr sitzt.

Durch Lüften des im Trichter befindlichen Korkes wird das kondensierte Wasser wieder in den Kolben zurück gelassen. Dieses Verfahren ist recht vorteilhaft und dabei sehr einfach. Schlechte Glasgefäße erkennt man übrigens sofort daran, daß sie beim Ausspülen mit dem Indikatorwasser einen spontanen Farbumschlag in Rot bewirken. Solches Material ist von vornherein auszuschließen.

Nach erfolgter Verdünnung der $1/10$ -n-Flüssigkeiten mit der zehnfachen (gefärbten!) Wassermenge ist die Kontrolle zu machen, ob die Säure mit der Lauge auch übereinstimmt. Zur Prüfung nehme man mindestens eine halbe Bürette Säure und titriere sie mit der Natronlauge, nachdem man vorher einige Tropfen einer 1%igen wässrigen Lösung von alizarinsulfosaurem Natron hinzugefügt hat.

In die Vorlage V, die selbstverständlicherweise auch ausgekühlt werden soll, bringt man nach ihrer Durchspülung mit Indikatorwasser die zum Auffangen des Ammoniaks ausreichende Säuremenge und außerdem noch einen geringen Überschuß. Wie gesagt, verbrenne man nur soviel Substanz, daß man mit einer Säuremenge von etwa 10 bis 20 ccm auskommt. Mehr Säure zu nehmen ist deshalb unvorteilhaft, weil die Absorptionsflüssigkeit infolge Durchstreichens des Luftstroms ohnehin schon Blasen wirft, die mit etwas Spritzgefahr verbunden sind, der man freilich leicht aus dem Wege geht, so lange nicht

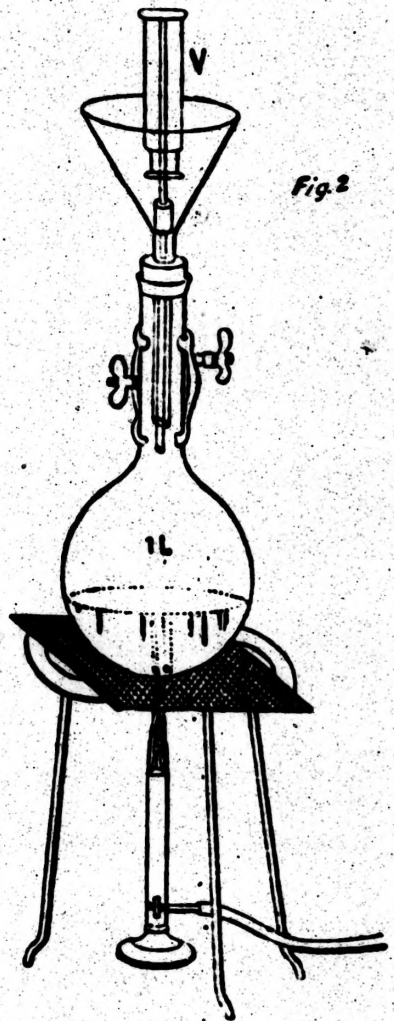
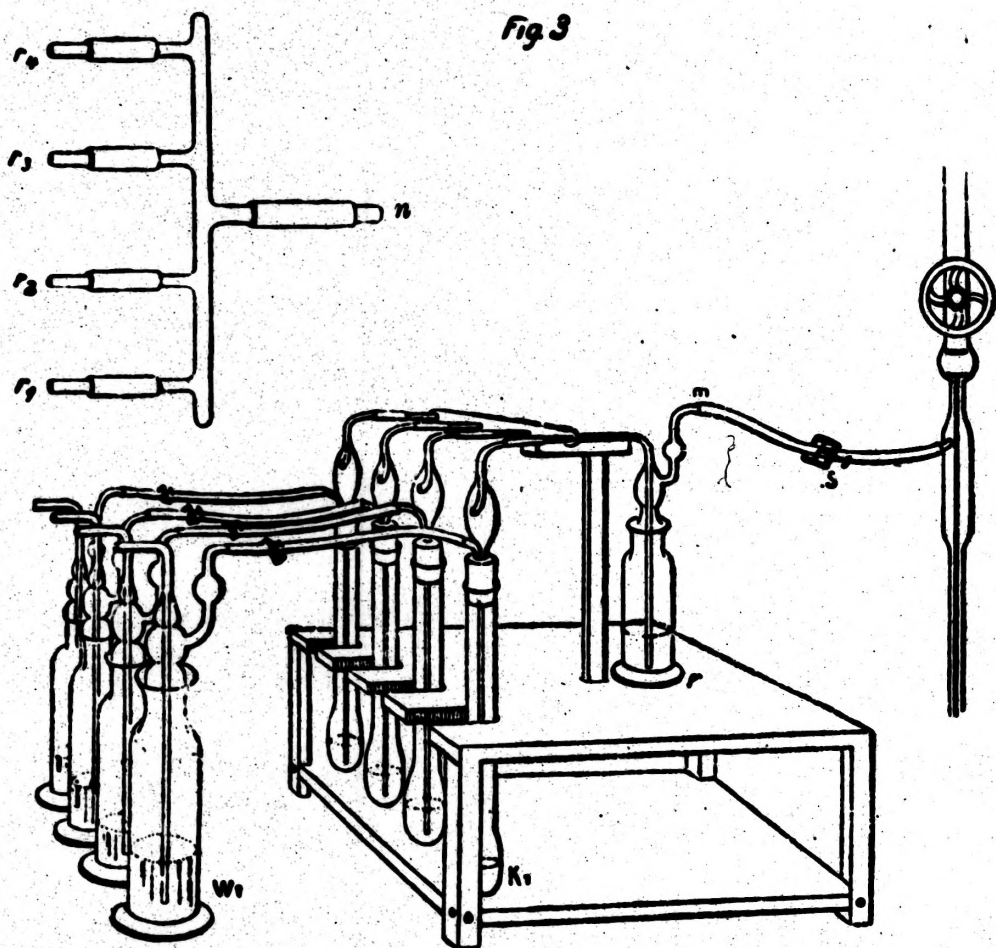


Fig. 2

so viel Säure in V ist, daß ein Mitreißen der verspritzten Teilchen unvermeidlich ist.

Beendigung der Analyse.

Nachdem man mit der 33%igen Natronlauge überalkalisiert hat, läßt man die Luft im oben angegebenen Tempo



weiter durch den Apparat streichen. Nach unserer Erfahrung genügt zum quantitativen Austreiben des Ammoniaks jene Zeit, nach welcher die Flüssigkeit wieder abgekühlt ist. Diesen Zeitpunkt kann man in ganz einfacher Weise durch Befühlen mit der Hand feststellen. In der Regel dauert es 20 Minuten. Ist dieser Zeitpunkt erreicht, so löst man die Schlauchverbindung bei *n* (Fig. 1) und erst nachher bei *m*. Jetzt entfernt man den Einsatz aus der Vorlage V, spült ihn innen und außen mit Indikatorwasser ab und titriert die Säure

unter Hinzufügung eines Tropfens vom Indikator (s. oben) mit der $\frac{1}{100}$ -n-Natronlauge zurück.

Jeder Kubikzentimeter der verbrauchten $\frac{1}{100}$ -n-Säure zeigt 0,00014 g N an.

Es kommt bei biologischen Arbeiten häufig vor, daß man eine Substanz zur Analyse hat, die zwar sehr geringe Stickstoffmengen enthält, daneben aber so voluminös ist, daß die oben angegebene Menge an rauchender Schwefelsäure zur Verbrennung keineswegs ausreicht. Substanzen dieser Be-

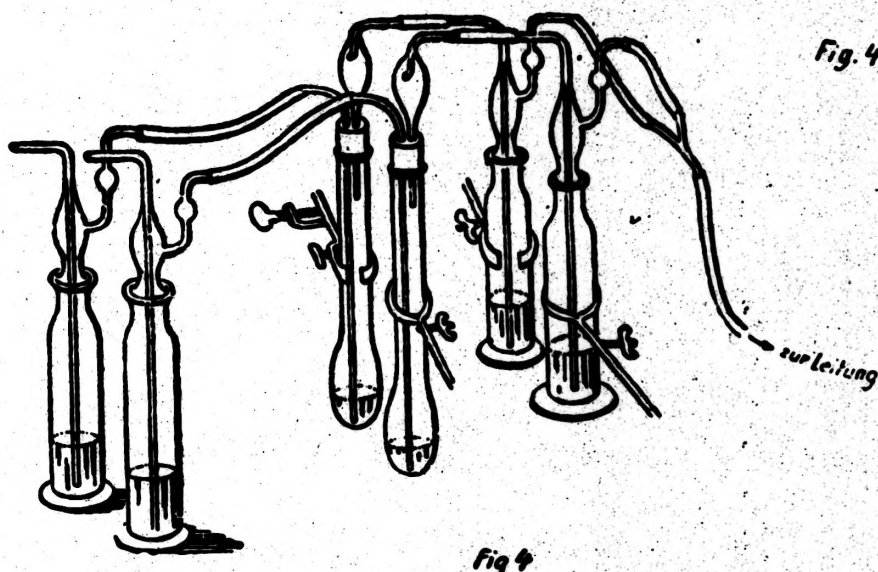


Fig 4

schaffenheit erhält man beispielsweise bei Eindampfen der aliquoten Mengen von eiweißhaltigen Flüssigkeiten (Spinalflüssigkeit usw.). Oder man ist aus einem bestimmten Grunde genötigt, eine Substanz mit dem Filter zusammen zu verbrennen usw. Aus den bereits erwähnten Gründen ist es nicht angängig, größere Schwefelsäuremengen zu verwenden. Ein Abrauchen der Schwefelsäure nimmt viel zu viel Zeit in Anspruch und wäre auch aus anderen, bekannten Gründen keine einwandfreie Methode. Man kann sich in diesem Falle so behelfen, daß man die zu verbrennende Substanz (Flüssigkeit usw.) auf mehrere Verbrennungskolben verteilt, so daß man in jeder Probe mit der gewöhnlichen Säuremenge auskommt.

Die Fig. 3 zeigt eine Anordnung, um diese Proben in einem gemeinsamen Apparat weiter zu behandeln. Wie man sieht, werden hier vier Verbrennungsproben zusammen, d. h. mit Hilfe einer Pumpe durchlüftet, und zwar so, daß das ausgetriebene Ammoniak in einer gemeinsamen Vorlage absorbiert wird, so daß schließlich nur eine einzige Titration nötig ist.

Die Fig. 4 zeigt ferner eine Reihe von Einzelbestimmungen, die mit einer einzigen Wasserstrahlpumpe in Verbindung stehen. Diese Anordnung ist für Laboratorien, die mit beschränkter Pumpenzahl arbeiten müssen, von Vorteil, da sie die Ausführung mehrerer Parallelbestimmungen mit einer einzigen Pumpe erlaubt.¹⁾

Beleganalysen.

Harnstoff.

0,003463 g Substanz verbrauchten 11,50 ccm $\frac{1}{100}$ -N-Säure.

Berechnet 46,66% N.

Gefunden 46,52% N.

Alanin.

0,0115 g Substanz verbrauchten 12,85 ccm $\frac{1}{100}$ -N-Säure.

Berechnet 15,73% N.

Gefunden 15,65% N.

Tyrosin.

0,01067 g Substanz verbrauchten 5,98 ccm $\frac{1}{100}$ -N-Säure.

Berechnet 7,74% N.

Gefunden 7,85% N.

Cystin.

0,01242 g Substanz verbrauchten 10,21 ccm $\frac{1}{100}$ -N-Säure.

Berechnet 11,66% N.

Gefunden 11,51% N.

¹⁾ Selbstverständlich kann die ganze Apparatur durch Anwendung eines Kühlers so umgestaltet werden, daß auch ein Erhitzen beim Übertreiben der Ammoniakdämpfe möglich wird. Wir haben absichtlich auf alle diese Komplikationen verzichtet, weil uns ausschließlich daran lag, eine möglichst einfach zu handhabende Methode zu erhalten.

l-Leucyl-triglycyl-l-leucyl-triglycyl-l-leucyl-triglycyl-l-leucyl-pentaglycyl-glycin.

0,0094 g Substanz verbrauchten 13,25 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Säure für $C_{24}H_{40}N_{10}O_{20}$ (= 1325,89 g).

Berechnet 20,08 % N.

Gefunden 19,75 % N.

Harn.

5 ccm normaler menschlicher Harn verbrauchen nach der gewöhnlichen Kjeldahl-Methode 23,58 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure.

0,5 ccm des gleichen Harns verbrauchen nach der Mikro-methode 23,56 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Säure.
