

Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptide und der Hippursäure im Harn durch Formoltitration.

II. Mitteilung.

Von

V. Henriques und S. P. L. Sørensen.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der kgl. tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule und aus dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Dezember 1909.)

In dieser Zeitschrift hat neuerdings L. de Jager¹⁾ eine Arbeit mit dem Titel «Beiträge zur Harnchemie» veröffentlicht. Jager macht in seiner Abhandlung auf das folgende eigentümliche Verhältnis aufmerksam: Bei der Formoltitrierung einer Mischung von Glykokoll und Salmiak wird eine geringere Natronmenge verbraucht als die Summe der bei getrennter Formoltitrierung von den einzelnen Bestandteilen der Mischung verbrauchten Natronmengen. Es handelt sich hier um eine bisher übersehene Fehlerquelle bei der Formoltitration, und wir haben daher einige Versuchsreihen angestellt, um die Bedeutung dieser Fehlerquelle unter verschiedenen Umständen und zwar besonders bei Harnanalysen feststellen zu können. Es geht aus diesen, im ersten Abschnitte der gegenwärtigen Abhandlung besprochenen Versuchen hervor, daß die Jagersche Beobachtung richtig ist, und daß die erwähnte Fehlerquelle von Bedeutung sein kann, wenn hinlänglich große Ammoniakmengen anwesend sind.

Bei der Formoltitrierung normaler Harnen auf die von uns angegebene Weise²⁾ ist der Fehler, wie wir nachweisen konnten und wie es im zweiten Abschnitte dieser Abhandlung erwähnt worden ist, kaum oder gar nicht merkbar. Bei Unter-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXII, S. 333 (1909).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 2 (1909).

suchung sehr ammoniakreicher Harnе und besonders solcher Harnе, die zwecks Spaltung von Polypeptiden mit Salzsäure eingedampft worden sind,¹⁾ kann man dagegen die hier erwähnte Fehlerquelle nicht außer acht lassen. In solchen Fällen muß das Ammoniak vor der Formoltitrierung entfernt werden; ein diesem Zweck entsprechendes Verfahren, welches selbstverständlich auch benutzt werden kann, selbst wenn nur kleine Ammoniakmengen anwesend sind, wird gleichfalls im zweiten Abschnitte dieser Abhandlung beschrieben.

Da es auch in der allerletzten Zeit²⁾ in Zweifel gezogen worden ist, ob normaler Menschenharn sicher nachweisbare Mengen von Aminosäuren regelmäßig enthält, haben wir unsere ganze Versuchsmethodik noch einmal durchgemustert. Ganz besonders haben wir die Aufmerksamkeit auf eventuelle Fehlerquellen bei unserem Verfahren zur Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Harnе gerichtet. Einige zur Beleuchtung dieser Frage angestellte Versuche sind im dritten Abschnitte der gegenwärtigen Abhandlung erwähnt. Aus dieser kritischen Durchmusterung unserer Versuchsmethodik und unserer Versuchsergebnisse glauben wir den Schluß ziehen zu dürfen, daß die denselben anhaftenden Fehler nur von untergeordneter Bedeutung sind, und daß sowohl Aminosäuren wie auch Polypeptide als normale Bestandteile des Harns, auch im Menschenharnе, regelmäßig vorkommen.

Wir haben die üblichen Bezeichnungen «Aminosäuren» und «Polypeptide» beibehalten, obwohl diese Namen den Ergebnissen der Formoltitrationen nicht vollständig entsprechen. Bei der Aminosäurebestimmung z. B. werden nicht nur die in die eigentlichen Aminosäuren (z. B. dem Glykokoll) eingehenden Aminogruppen, sondern auch die in den Polypeptiden und noch komplizierteren Eiweißabkömmlingen vorhandenen formoltitierbaren Aminogruppen bestimmt. Wir werden daher, um Mißverständnissen vorzubeugen, ausdrücklich betonen, daß unter dem üblichen kürzeren Ausdruck «Aminosäurestickstoff» die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 36 (1909).

²⁾ Siehe: H. Malfatti, Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 499 (1909) und G. Oehler, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXI, S. 484 (1909).

neben dem Ammoniakstickstoff noch vorhandene formoltitrierbare Stickstoffmenge zu verstehen ist. Ebenso wird unter dem «Polypeptidstickstoff» die peptidgebundene Stickstoffmenge verstanden; diese letztere, korrekte und dabei ziemlich kurze Ausdrucksweise ist sowohl in dieser wie in unserer ersten Abhandlung öfters benutzt worden.

I.

Für die folgenden Versuche wurden $\frac{1}{5}$ molekulare wässrige Lösungen von Ammoniumchlorid (Amm.), Glykokoll (Glyk.), Alanin (Al.), Leucin (Leuc.) und Serin (Ser.) benutzt; der Leucinlösung war außerdem, der Schwerlöslichkeit des Leucins wegen, so viel Natronlauge zugesetzt, daß die Lösung auch in bezug auf Natron $\frac{1}{5}$ molekular war.

Die Formoltitrierungen wurden ganz wie früher beschrieben ausgeführt, indem immer bis zu stark roter Farbe mit Phenolphthalein (drittes Stadium)¹⁾ titriert wurde. Den verschiedenen Mischungen wurde im voraus so viel Wasser zugesetzt, daß das Volumen nach vollendeter Titrierung immer ungefähr 60 ccm betrug. Für jede Analyse wurden 10 ccm neutralisiertes Formol benutzt, die Kontrollösung wurde dementsprechend aus 45 ccm ausgekochtem Wasser, 10 ccm neutralisiertem Formol, ca. 2,5 ccm $\frac{n}{5}$ -Natronlauge und ca. 2,5 ccm $\frac{n}{5}$ -Salzsäure bereitet. Wenn nicht anders angegeben ist, wurde die Titrierung unmittelbar nach dem Formolzusatz ausgeführt und im Laufe von ca. 2 Minuten vollendet.

Die unten tabellarisch zusammengestellten Versuchsergebnisse sind ohne nähere Erklärung verständlich, nur die in der letzten Kolonne der Tabelle I, II und III angeführten Zahlen bedürfen einer näheren Besprechung. Wenn Aminosäurelösungen formoltitriert werden, beobachtet man, daß die titrierten Lösungen beim Stehenlassen gewöhnlich ein bißchen schneller als die Kontrollösung verblassen; Aminosäurelösungen mit reichlichem Ammoniumsalz verhalten sich dagegen umgekehrt, indem dieselben beim Stehenlassen nach der Formoltitrierung

¹⁾ S. P. L. Sørensen, Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 65 (1907).

eine stärker und stärker rote Farbe annehmen. Um einen Begriff von der Stärke dieses «Nachblassens» und «Nachrötens» zu gewinnen, haben wir sämtliche Analysen nach zweistündigem Stehenlassen bis zu der Farbe der Kontrollösung mit $n/5$ -Natronlauge bzw. $n/5$ -Salzsäure zurücktitriert; die bei diesen «Nachtitrationsen» erforderlichen Base- bzw. Säuremengen sind in der letzten Kolonne der Tabelle I, II und III verzeichnet.

Tabelle I.

Ver- suchs- num- mer	Die Zusammensetzung der zur Formoltitrierung vorliegenden Mischung				Die bei der Formoltitrie- rung im ganzen ver- brauchte $n/5$ - Natronlauge		Nach zwei- stündigem Stehenlassen wurden verbraucht
	in ccm		in % der berechneten- Menge				
1	2 ccm Amm.	+ 0 ccm Glyk.	+ 41 ccm H ₂ O	1,98	99,0	kein Verbr.	
2	5 » »	+ 0 » »	+ 35 » »	4,91	98,2	do.	
3	10 » »	+ 0 » »	+ 25 » »	9,85	98,5	0,05 ccm NaOH	
4	20 » »	+ 0 » »	+ 5 » »	19,68	98,4	do.	
5	0 » »	+ 2 » »	+ 41 » »	1,98	99,0	kein Verbr.	
6	0 » »	+ 5 » »	+ 35 » »	4,90	98,0	do.	
7	0 » »	+ 10 » »	+ 25 » »	9,85	98,5	0,05 ccm NaOH	
8	0 » »	+ 20 » »	+ 5 » »	19,75	98,7	do.	
9	2 » »	+ 2 » »	+ 37 » »	3,93	98,2	0,07 ccm HCl	
10	2 » »	+ 5 » »	+ 31 » »	6,80	97,1	do.	
11	2 » »	+ 10 » »	+ 21 » »	11,72	97,7	0,04 ccm HCl	
12	2 » »	+ 20 » »	+ 1 » »	21,62	98,3	kein Verbr.	
13	5 » »	+ 2 » »	+ 31 » »	6,70	95,7	0,21 ccm HCl	
14	5 » »	+ 5 » »	+ 25 » »	9,50	95,0	0,26 » »	
15	5 » »	+ 10 » »	+ 15 » »	14,46	96,4	0,30 » »	
16	5 » »	+ 20 » »	+ 0 » »	24,05	96,2	0,15 » »	
17	10 » »	+ 2 » »	+ 21 » »	11,20	93,3	0,35 » »	
18	10 » »	+ 5 » »	+ 15 » »	13,66	91,1	0,47 » »	
19	10 » »	+ 10 » »	+ 5 » »	18,40	92,0	0,45 » »	
20	20 » »	+ 2 » »	+ 1 » »	20,47	93,0	0,20 » »	
21	20 » »	+ 5 » »	+ 0 » »	22,24	89,0	0,47 » »	

Tabelle II.

Versuchsnummer	Die Zusammensetzung der zur Formoltitrierung vorliegenden Mischung	Die bei der Formoltitrierung im ganzen verbrauchte $\frac{n}{5}$ -Natronlauge		Nach zweistündigem Stehenlassen wurden verbraucht
		in ccm	in % der berechneten Menge	
22	10 ccm Amm. + 25 ccm H ₂ O	9,90	99,0	0,05 ccm NaOH
23	10 „ Glyk. + 25 „ „	9,85	98,5	do.
24	10 „ Al. + 25 „ „	9,70	97,0	„
25	10 „ Leuc. + 35 „ „	9,80	98,0	„
26	10 „ Ser. + 25 „ „	9,85	98,5	„
27	10 ccm Amm. + 10 ccm Glyk. + 5 ccm H ₂ O	18,50	92,5	0,52 ccm HCl
28	10 „ „ + 10 „ Al. + 5 „ „	18,65	93,2	0,40 „ „
29	10 „ „ + 10 „ Leuc. + 15 „ „	18,20	91,0	0,20 „ „
30	10 „ „ + 10 „ Ser. + 5 „ „	19,15	95,7	0,31 ccm NaOH
31	10 „ Glyk. + 10 „ Al. + 5 „ „	19,53	97,6	0,20 „ „
32	10 „ „ + 10 „ Leuc. + 15 „ „	19,55	97,7	0,20 „ „
33	10 „ „ + 10 „ Ser. + 5 „ „	19,80	99,0	0,10 „ „
34	10 „ Al. + 10 „ Leuc. + 15 „ „	19,40	97,0	0,15 „ „
35	10 „ „ + 10 „ Ser. + 5 „ „	19,57	97,8	0,20 „ „
36	10 „ Leuc. + 10 „ „ + 15 „ „	19,68	98,4	0,10 „ „

Aus der Tabelle I geht es deutlich hervor, daß ganz wenig Ammoniaksalz (Vers. Nr. 9—12) keinen sicher nachweisbaren Einfluß in der hier erwähnten Beziehung auszuüben vermag. Etwas größere Ammoniakmengen (Vers. Nr. 13—16; in normalem Harne des Menschen sind Aminosäuren und Ammoniak in ungefähr denselben Mengen vorhanden wie in Versuch Nr. 13) rufen wohl einen sicher erkennbaren Fehler hervor, man ersieht aber leicht aus der vierten Kolonne der Tabelle, daß die verbrauchten Natronmengen nur ein wenig niedriger sind als der durchschnittliche Mittelwert (97,5%),¹⁾ mit welchem man

¹⁾ Vgl. S. P. L. Sörensen, Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 79 (1907), und V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 29 (1909).

bei Formoltitrationen bis zu stark roter Farbe mit Phenolphthalein rechnen darf. Erst bei noch größeren Ammoniakmengen (Vers. Nr. 17—21) tritt der Fehler deutlich hervor.

Aus der Tabelle II ergibt es sich, daß die in Rede stehende Fehlerquelle aus dem Ammoniak und nicht aus der Aminosäure ihren Ursprung hat, denn nur die Mischungen von Ammoniumchlorid und einer Aminosäure (Vers. Nr. 27—30) haben bei der Formoltitrierung ein zu niedriges Resultat, alle ammoniakfreien Mischungen von Aminosäuren (Vers. Nr. 31—36) dagegen ein völlig zufriedenstellendes Resultat gegeben.

Es erhebt sich jetzt die Frage: Auf welche Weise läßt sich diese Anomalie bei der Formoltitrierung chemisch erklären? Obwohl wir keine endgültige Antwort auf diese Frage geben können, werden wir es doch nicht unterlassen, noch einige Versuche zu erwähnen, die vielleicht die Richtung angeben können, in welcher die gewünschte Erklärung zu suchen ist.

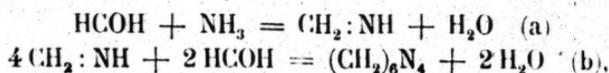
Während die Umsetzung zwischen Formol und einer Aminosäure sich nach folgender Gleichung vollzieht:



wird bekanntlich durch Einwirkung von Formol auf Ammoniak Hexamethylentetramin gebildet:



Denken wir uns, daß diese letztere Umsetzung in zwei Abschnitten verläuft:



haben wir in Gleichung (a) das vollständige Analogon zu der oben angeführten Umsetzungsgleichung zwischen Formol und einer Aminosäure; der einzige Unterschied besteht darin, daß die Methylenverbindung der Aminosäure neben dem Stickstoffatom kein, die in Gleichung (a) eingehende hypothetische Verbindung, Methylenimin, $\text{CH}_2 : \text{NH}$, dagegen neben dem Stickstoffatom noch ein reagierbares Wasserstoffatom enthält. Um die hier in Rede stehenden Unregelmäßigkeiten bei der Formoltitrierung erklären zu können, möchte man sich dann vorstellen, daß dieses als Zwischenprodukt gebildete Methylenimin

nicht nur mit Formol zu Hexamethylentetramin, sondern auch mit der Aminosäure — und zwar entweder mit der Aminogruppe oder mit der Carboxylgruppe — reagieren könnte. Im ersteren Falle möchte die alkalische Reaktion des gebildeten Atomkomplexes nicht durch Formol geändert werden, ganz wie wir es z. B. bei der Guanidinogruppe kennen; im letzteren Falle möchte das Methylenimin sich mit der Carboxylgruppe unter Wasserabspaltung vereinigen. In beiden Fällen würde der Nebenprozeß sich durch einen zu niedrigen Natronverbrauch bei der Formoltitrierung kundgeben.

Diesem Gedankengang folgend müßte man erwarten, daß der Fehler nur dem Ammoniak selbst, nicht aber den substituierten Ammoniaken anhaften würde, und es hat sich denn wirklich auch gezeigt, wie es aus der Tabelle III hervorgeht, daß Mischungen von Methylamin¹⁾ und Aminosäuren sich mit der üblichen Genauigkeit formoltitrieren lassen. Dagegen gibt eine Mischung von Methylamin und Ammoniak bei der Formoltitrierung einen zu niedrigen Natronverbrauch (Versuch Nr. 46, Tabelle III); diese Tatsache läßt sich selbstverständlich nur auf die erstere der oben erwähnten Weisen erklären.

Eine ca. 33%ige Lösung von reinem Methylamin (C. A. F. Kahlbaum) wurde mit Wasser verdünnt und mit Salzsäure genau neutralisiert (Indikator: empfindliches Lackmuspapier); schließlich wurde mit ausgekochtem Wasser so stark verdünnt, daß die Lösung ungefähr $\frac{1}{5}$ in bezug auf Methylamin war. Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab, daß 10 ccm der Lösung 29,90 mg Stickstoff enthielten; bei Formoltitrierung von 10 ccm der Lösung wird daher der berechnete Verbrauch an $\frac{1}{5}$ -Natronlauge $29,90 : 2,8 = 10,68$ ccm betragen.

Betrachtet man die in der letzten Kolonne der Tabellen I, II und III aufgezeichneten, bei der «Nachtitation» verbrauchten Base- bzw. Säuremengen, ersieht man, daß alle diejenigen Mischungen, die sich bei der Formoltitrierung normal verhalten, bei der «Nachtitation» höchstens 0,2 ccm, gewöhnlich aber

¹⁾ Nach L. Henry (Bull. Acad. Roy. de Belgique [3], Bd. XXIX, S. 24 [1895]) gibt Methylamin und Formol nicht direkt Methylenmethylamin, $\text{CH}_2 : \text{N} \cdot \text{CH}_3$, sondern, wie man erwarten müßte, den Aminomethylalkohol, welcher erst durch Behandlung mit festem Kaliumhydroxyd in Methylenmethylamin verwandelt wird.

Tabelle III.

Ver- suchs- num- mer	Die Zusammensetzung der zur Formoltitrierung vorliegenden Mischung	Die bei der Formoltitrie- rung im ganzen ver- brauchte n/5- Natronlauge		Nach zwei- stündigem Stehenlassen wurden ver- braucht
		in ccm	in % der berech- neten Menge	
37	10 ccm Methylamin + 25 ccm H ₂ O	10,60	99,2	0,05 ccm NaOH
38	10 » Glyk. + 25 » »	9,82	98,2	do.
39	10 » Al. + 25 » »	9,72	97,2	»
40	10 » Leuc. + 35 » »	9,75	97,5	»
41	10 » Serin + 25 » »	9,88	98,8	kein Verbr.
42	10 ccm Methylamin + 10 ccm Glyk. + 5 ccm H ₂ O	20,53	99,3	do.
43	10 ccm Methylamin + 10 ccm Al. + 5 ccm H ₂ O	20,27	98,0	0,10 ccm NaOH
44	10 ccm Methylamin + 10 ccm Leuc. + 15 ccm H ₂ O	20,26	98,0	0,05 »
45	10 ccm Methylamin + 10 ccm Serin + 5 ccm H ₂ O	20,55	99,4	kein Verbr.
46	10 ccm Methylamin + 10 ccm Amm. + 5 ccm H ₂ O	19,40	93,8	0,60 ccm HCl

noch weniger, n/5-Natronlauge erfordert haben. Die Ursache ist offenbar darin zu suchen, daß die Umsetzung zwischen Formol und der Aminosäure nicht absolut momentan verläuft, und, wie schon oben angeführt, wurde jede der hier erwähnten Analysen im Laufe von ca. 2 Minuten ausgeführt. Handelt es sich dagegen um Mischungen von Ammoniak und Aminosäuren, begegnen wir dem eigenartigen Verhältnisse, daß diese Lösungen, obwohl der Natronverbrauch bei der Formoltitration viel niedriger als der berechnete gewesen ist, doch beim Stehenlassen stärker und stärker rot werden und bei der «Nachtitration» ziemlich bedeutende Salzsäuremengen erfordern. Der Grund hierzu liegt wahrscheinlich teils darin, daß der Nebenprozeß, welcher den hier erwähnten Fehler bedingt, langsamer als die Hauptumsetzung verläuft, teils auch darin, daß dieser letztere Prozeß

reziprok ist und daher zurückgehen kann, je nachdem der Nebenprozeß vorwärts schreitet. Bei der Formoltitrierung einer ammoniakreichen Aminosäuremischung ist daher die Dauer der Titrierungsoperationen von Bedeutung, wie es aus den folgenden Beispielen erhellen wird.

a) 10 ccm Ammoniumchlorid + 10 ccm Glykokoll wurden mit 19,70 ccm $\frac{n}{5}$ -Natronlauge (die Summe der in Versuch Nr. 3 und Nr. 7, Tabelle I, verbrauchten Mengen) gemischt und erst danach Formol zugesetzt. In dem ersten Augenblick nach dem Formolzusatz war die Lösung deutlich schwächer rot als die Kontrollösung, deren Farbstärke erst durch Zusatz von noch zwei Tropfen Natronlauge erreicht wurde. Die Lösung begann aber bald stärker rot zu werden, und schon nach dem Verlaufe einer Minute war sie viel stärker rot geworden als die Kontrollösung. Nach zweistündigem Stehenlassen wurde bei der «Nachtitration» 1,36 ccm $\frac{n}{5}$ -Salzsäure verbraucht.

b) Eine Mischung von 10 ccm Amm. und 10 ccm Glyk. wurde mit Formol versetzt und gleich darauf im Laufe von 2 Minuten bis zu der Farbe der Kontrollösung titriert.

Verbrauch: 18,40 bezw. 18,50 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH.

Nachtitration: 0,45 » 0,52 » $\frac{n}{5}$ -HCl.

(Versuch Nr. 19, Tabelle I, und Nr. 27, Tabelle II).

c) Die Mischung von 10 ccm Amm. + 10 ccm Glyk. + Formol wurde $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen und danach titriert.

Verbrauch: 18,32 ccm NaOH; Nachtitration: 0,41 ccm HCl.

d) Wie bei c); nur wurde die Mischung 2 Stunden stehen gelassen und darauf titriert.

Verbrauch: 18,35 ccm NaOH; Nachtitration: 0,25 ccm HCl.

Es hat sich durch weitere Versuchsreihen ergeben, daß auch die Wasserstoffionenkonzentration der Mischung während dem Stehenlassen für die Geschwindigkeit, mit welcher der Nebenprozeß verläuft, von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Als Beispiel werden wir eine Versuchsreihe anführen, bei welcher der Mischung von 10 ccm Amm. und 10 ccm Glyk. vor dem Formolzusatz 22 ccm $\frac{n}{5}$ -Natronlauge zugefügt wurden.

	Gleich titriert:	Verbr.:	19,75 ccm NaOH;	Nachtitr.:	1,58 ccm HCl
Nach $\frac{1}{2}$ Stunde	»	»	19,17	»	»
» 2 Stunden	»	»	18,87	»	»
» 4 »	»	»	18,74	»	»
					1,09
					0,85
					0,73

Man ersieht, daß der Nebenprozeß viel langsamer in alkalischer als in saurer Lösung verläuft; sobald aber der große Natronüberschuß während der Titrierung neutralisiert worden

ist, geht der Nebenprozeß viel schneller von statten (hohe Zahlen bei den «Nachtitrationen»).

Den schließlichen Gleichgewichtszustand haben wir nicht zu bestimmen versucht; derselbe ist aber wahrscheinlich von vielen Faktoren, unter welchen auch die Wasserstoffionenkonzentration, die Temperatur und die verwendete Aminosäure zu nennen sind, abhängig. Ein in dieser Beziehung lehrreiches Beispiel bieten die Mischungen von Ammoniumchlorid und Serin.

Eine Mischung von 10 ccm Amm. + 10 ccm Serin + 19,80 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH nahm mit Formol versetzt genau die Farbe der Kontrollösung an. Im Laufe von ein paar Minuten wurde die Lösung aber deutlich stärker rot, und nach zweistündigem Stehenlassen wurden 0,10 ccm $\frac{n}{5}$ -HCl verbraucht.

Wurde dagegen die Mischung von Ammoniumchlorid und Serin ohne vorherigen Natronzusatz mit Formol behandelt und darauf gleich titriert, ging in der sauren Lösung der Nebenprozeß viel schneller vor sich, und der Natronverbrauch betrug nur 19,13 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH. In diesem Fall ist der Nebenprozeß aber über den für Serinmischungen bei der der Farbstärke der Kontrollösung entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration charakteristischen Gleichgewichtszustand hinausgegangen, und man sieht daher, daß die Lösung beim Stehenlassen bald entfärbt wird. In dem besprochenen Beispiel wurde bei der Nachtitration 0,25 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH verbraucht.

Versuch Nr. 30, Tabelle II, gibt ein anderes ähnliches Beispiel: Verbrauch: 19,15 ccm NaOH; Nachtitration: 0,31 ccm NaOH.

Schon aus den von de Jager ausgeführten Versuchen (l. c. S. 342) ersieht man, daß es ziemlich gleichgültig ist, ob die Salmiak- und die Glykokollösung vor dem Formolzusatz vermischt werden, oder ob zuerst die Glykokollösung mit Formol behandelt und mit Natron neutralisiert und erst dann die Salmiaklösung zugesetzt und eine zweite Neutralisation ausgeführt wird; der Fehler wird in beiden Fällen ungefähr derselbe sein. Einen weit geringeren Fehler bekommt de Jager, wenn zuerst die Salmiaklösung mit Formol behandelt und mit Natron neutralisiert und darauf die Glykokollösung zugesetzt und die zweite Neutralisation vorgenommen wird. Auch diese merkwürdige Tatsache wird verständlich, wenn man das Methylenimin, $\text{CH}_2 : \text{NH}$, als Zwischenglied bei der Bildung von Hexamethylentetramin annimmt. Man müßte demnach erwarten, daß, je länger die Salmiaklösung mit Formol gestanden hat,

bevor die Glykokollösung zugesetzt wird, desto weiter muß die Bildung von Hexamethylentetramin fortgeschritten und desto geringer deshalb der Fehler sein. Versuche haben diese Annahme bestätigt.

10 ccm Amm. für sich allein titriert: Verbrauch: 9,85 ccm NaOH

10 „ Glyk. „ „ „ „ „ „ 9,85 „ „

10 ccm Amm. + 10 ccm Glyk. gemischt und darauf titriert, Verbrauch 18,40 ccm NaOH; außer den dem Salmiak entsprechenden 9,85 ccm Natron werden also in diesem Fall für das Glykokoll nur 8,55 ccm Natron übrig.

Wird dagegen die Salmiaklösung zuerst allein titriert (Verbrauch: 9,85 ccm Natron) und dann nach den unten angeführten Zeiten die Glykokollösung zugesetzt und die zweite Titrierung ausgeführt, werden für das Glykokoll größere Mengen von Natronlauge zur Neutralisation verbraucht.

Die mit Formol behandelte und darauf neutralisierte Salmiaklösung wurde stehen gelassen	Die Glykokollösung verbrauchte	Nachtitration nach 2 Stunden
3 Minuten	9,32 ccm NaOH	0,27 ccm HCl
30 „	9,51 „ „	0,30 „ „
2 Stunden	9,60 „ „	0,28 „ „
4 „	9,70 „ „	0,23 „ „

II.

Welche Bedeutung ist nun bei den üblichen Formoltitrationen und ganz besonders bei den Harnuntersuchungen der im vorigen Abschnitte besprochenen Fehlerquelle beizumessen?

Wie schon oben (S. 124) erwähnt, geht es aus der Tabelle I unzweideutig hervor, daß ganz wenig Ammoniak keinen sicher nachweisbaren Einfluß auf die Genauigkeit der Formoltitrierung ausübt, und wir dürfen daher aus unseren Versuchsergebnissen erstens den Schluß ziehen, daß die hier in Rede stehende Fehlerquelle bei Untersuchung von Eiweißspaltprodukten, von welchen das Ammoniak gewöhnlich nur einen kleinen Bruchteil ausmacht, keine Rolle spielt.

Ferner ersehen wir, daß auch bei Formoltitrationen von normalen, nicht allzu ammoniakreichen Harnen der Fehler von ganz untergeordneter Bedeutung sein muß. Hiermit übereinstimmend hat es sich denn auch gezeigt, daß die Aminosäurebestimmungen im Harne auf die alte, von Henriques-Sörensen¹⁾ ausgearbeitete Weise Werte gegeben haben, die innerhalb der Fehlergrenze der Methode mit den Werten zusammenfallen, die wir erhalten haben durch Anwendung eines modifizierten, neuen, unten beschriebenen (S. 134) Verfahrens, bei welchem das Ammoniak vor der Formoltitrierung entfernt wird. Die in der Tabelle IV gegebene Zusammenstellung von Analysen eines und desselben Harns sowohl nach dem alten wie auch nach dem neuen Verfahren wird das hier Angeführte zur Genüge beweisen.

Tabelle IV.

	Diurese ccm	Der totale Stickstoff- gehalt des Harns in %	In 16 ccm des Harns wurde gefunden		
			Am- moniak- stickstoff in mg	Aminosäurestickstoff in mg	
				nach der alten Methode	nach der neuen Methode
Harn eines gesunden Menschen	1160	1,00	8,43	2,77	3,08
do.	1360	0,78	6,86	2,24	2,24
Harn eines mit Fleisch gefütterten Hundes	250	5,27	20,45	6,43	6,44
do.	330	—	11,90	4,34	4,20
»	300	4,55	15,36	8,86	8,54
»	250	5,02	21,88	9,48	9,38
»	354	4,54	21,70	6,16	6,30

Wir können noch hinzufügen, daß wir bei Formoltitrationen im Harne ein «Nachröten» nicht beobachtet haben. Der Grund hierzu ist wahrscheinlich in dem oben (S. 127) besprochenen Verhältnis zu suchen, daß die Umsetzung zwischen Formol und

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 2 (1909).

den Aminosäuren nicht absolut momentan verläuft, weshalb eine ammoniakfreie Aminosäurelösung bei der Formoltitrierung oft in geringem Grade «nachblassen» wird. Im Harne wird demnach das durch den verhältnismäßig geringen Ammoniakgehalt verursachte «Nachröten» durch das erwähnte «Nachblassen» kompensiert werden.

Wir glauben somit aussprechen zu dürfen, daß die von dem Ammoniakgehalt des Harns herrührende Fehlerquelle die Genauigkeit der Aminosäurebestimmung im Harne nach dem von uns gegebenen Verfahren nur in ganz unwesentlichem Grade beeinträchtigen wird.

Anders stellt sich die Sache, wenn von der Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Harne und zwar besonders im harnstoffreichen Harne die Rede ist. Der Harn wird zu diesem Zweck mit Salzsäure gekocht, wodurch unter Harnstoffzersetzung reichliche Mengen von Ammoniak gebildet werden. Schon in einer früheren Abhandlung¹⁾ haben wir erwähnt, daß die Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Harne von ausschließlich mit Fleisch ernährten Hunden mit Schwierigkeiten verknüpft war, die wir in dem großen Ammoniakgehalt des mit Salzsäure gekochten Harns suchten, ohne die wirkliche, von de Jager jetzt nachgewiesene Ursache zu kennen. In solchen Fällen ist es notwendig, vor der Formoltitrierung das Ammoniak auszutreiben, und wir haben daher unsere Methode dementsprechend modifiziert.

Der Vollständigkeit halber haben wir unten sowohl die alte, nur bei Aminosäurebestimmungen brauchbare, wie auch die neue, modifizierte Methode, die selbstverständlich nicht nur bei der Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge, sondern auch bei Aminosäurebestimmungen brauchbar ist, genau beschrieben.

A. Die alte Methode. (Zur Bestimmung von Ammoniak und Aminosäuren brauchbar.)

In einen 100 ccm-Meßkolben werden 50 ccm Harn abpipettiert und mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung (0,5 g Phenol-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 38 (1909).

phthalein in 50 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser gelöst) und mit 2 g festem Baryumchlorid versetzt. Nach Umschütteln bis zur Lösung des Baryumchlorids wird eine gesättigte Lösung von Baryumhydroxyd bis zu roter Farbe und darauf noch 5 ccm zugesetzt, worauf der Kolben bis zu der Marke mit Wasser gefüllt wird. Nach gutem Umschütteln wird der Kolben 15 Minuten stehen gelassen, worauf man durch einen trockenen Filter filtriert.

80 ccm des klaren roten Filtrats (40 ccm Harn entsprechend) werden in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht, worauf die Flüssigkeit durch Zusatz von $\frac{1}{5}$ -Salzsäure und mit empfindlichem Lackmuspapier¹⁾ als Indikator neutralisiert und darauf mit ausgekochtem (kohlenstoffsaurefreiem!) Wasser bis auf 100 ccm verdünnt wird.

In gleich großen Teilen der neutralen Flüssigkeit, z. B. in 40 ccm (16 ccm Harn entsprechend) bestimmt man teils das Ammoniak, teils die formoltitrierbare Stickstoffmenge.

¹⁾ Da es selbstverständlich von großer Bedeutung ist, daß das Lackmuspapier sowohl eine große Empfindlichkeit wie auch den richtigen Umschlagspunkt anzeigt, werden wir hier die Bereitungs- und Prüfungsweise unseres empfindlichen Lackmuspapiers anführen.

0,5 g fein gepulverten Azolithmins werden in einer Schale in 200 ccm Wasser + 22,5 ccm $\frac{1}{10}$ -Natronlauge gelöst und nach Filtrierung 50 ccm Alkohol zugesetzt. Durch diese Lösung werden Streifen guten, aschenarmen Filtrierpapiers gezogen und auf Schnüren getrocknet, was ungefähr eine Stunde in Anspruch nimmt.

Das Papier muß den Sörensenschen Phosphatlösungen (siehe: Biochem. Zeitschrift, Bd. XXI, S. 175, und Bd. XXII, S. 355 (1909) gegenüber sich auf die folgende Weise verhalten:

«3sek + 7prim» ($p_H = 6,47$): schwach saure Reaktion

«5sek + 5prim» („ = 6,81): neutrale

«7sek + 3prim» („ = 7,17): schwach alkalische

Der Neutralpunkt ist der Ammoniumsalze und der Aminosäuren wegen ein wenig saurer als der wirkliche Neutralpunkt ($p_H = 7,07$) gewählt (vgl. z. B. die Glykokollkurve auf der Hauptkurventafel in der eben zitierten Abhandlung Sörensens).

Sollte es geschehen, daß eine dargestellte Probe Lackmuspapier den Phosphatlösungen gegenüber nicht nach Wunsch reagiert, muß die der Azolithminlösung zugesetzte Natronmenge in entsprechender Weise geändert werden.

Die Ammoniakbestimmung haben wir immer durch Destillation im Vakuum wesentlich nach der von M. Krüger und O. Reich¹⁾ gegebenen Anordnung ausgeführt. Einige Einzelheiten bei der Destillation werden unten (S. 137) besprochen.

Die Formoltitrierung wird auf die von S. P. L. Sørensen²⁾ angegebene Weise mit $n/5$ -Natronlauge und $n/5$ -Salzsäure, mit Phenolphthalein als Indikator und bis zu stark roter Farbe der Kontrollösung (drittes Stadium) ausgeführt.

Bei der Ammoniakdestillation erhält man direkt den Ammoniakgehalt in 16 ccm Harn. Multipliziert man die bei der Formoltitrierung verbrauchte Menge $n/5$ -Natronlauge (in Kubikzentimeter) mit 2,8, erhält man die gesamte Stickstoffmenge (in Milligramm ausgedrückt), welche in 16 ccm Harn als Ammoniak- oder als Aminosäurestickstoff anwesend ist. Die Differenz zwischen dieser Stickstoffmenge und der als Ammoniak vorhandenen Stickstoffmenge gibt die Aminosäuremenge in 16 ccm Harn an.

B. Die neue Methode (zur Bestimmung von Ammoniak, Hippursäure, Aminosäuren und der peptidgebundenen Stickstoffmenge geeignet).

a) Bestimmung von Ammoniak und Aminosäuren. Wie oben unter A beschrieben, werden in einem 100 ccm Meßkolben 50 ccm Harn mit Phenolphthalein, Baryumchlorid und Baryumhydroxyd behandelt und bis zu 100 ccm verdünnt. Aus 80 ccm des klaren, roten Filtrats (40 ccm Harn entsprechend) wird das Ammoniak im Vakuum abdestilliert (siehe S. 137) und bestimmt.³⁾ Der Destillationsrückstand wird in dem Kolben in einigen Kubikzentimetern, zirka normaler Salzsäure gelöst, worauf unter Evakuierung kohlenstofffreie Luft hindurchgezogen wird, um eine eventuelle Spur von Kohlensäure auszu-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 170 (1903).²⁾

²⁾ Biochem. Zeitschrift. Bd. VII, S. 64 (1907).

³⁾ Selbstverständlich kann auch eine abgemessene Menge des nicht vorbehandelten Harns zur Ammoniakbestimmung dienen. Dieses ist aber gewöhnlich gar nicht notwendig, denn wir haben uns durch Kontrollversuche davon vergewissert, daß bei der Filtrierung der schwach alkalischen Lösung kein oder nur ganz zu vernachlässigende Mengen von Ammoniak verloren gehen.

treiben. Darauf wird die salzsaure Lösung quantitativ mittels kohlenstofffreien Wassers (daher nicht unter Benutzung der Spritzflasche) in einen 100 ccm-Meßkolben übergeführt. Die Flüssigkeit wird hiernach mit empfindlichem Lackmuspapier als Indikator genau neutralisiert (am besten durch Zutropfen von kohlenstofffreier, zirka normaler Natronlauge bis zu schwach roter Farbe und darauf folgender Zusatz von n_{5} -Salzsäure bis zu neutraler Reaktion auf Lackmuspapier); schließlich wird mit kohlenstofffreiem Wasser bis zur Marke nachgefüllt. In einer passenden Menge, z. B. 40 ccm, der neutralen Lösung (16 ccm Harn entsprechend) wird die Formoltitrierung, ganz wie oben unter A erwähnt, ausgeführt.

b) Bestimmung von Hippursäure und peptidgebundenem Stickstoff. 50 ccm Harn werden mit ca. 5 ccm ca. 5 n-Salzsäure versetzt und darauf 6 mal mit Athylacetat geschüttelt, um die Hippursäure zu extrahieren. Der zum Ausschütteln benutzte Essigester wird einmal mit Wasser gewaschen und darauf zur Hippursäurebestimmung verwendet, während das Waschwasser mit dem Harn gemischt, zur Bestimmung des peptidgebundenen Stickstoffs dient.

Der Essigester wird abdestilliert und der Rückstand zwei bis drei Stunden mit 50 ccm ca. 30%iger Salzsäure (in einem langhalsigen Kjeldahlkolben auf dem Drahtnetze) gelinde gekocht. Hierdurch wird die gesamte Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll gespalten, und die Stickstoffmenge des letzteren läßt sich dann nach Eindampfung der Lösung auf dem Wasserbade und Neutralisation mit n_{5} -Natronlauge (Lackmuspapier als Indikator) durch die übliche Formoltitration bestimmen.

Der hippursäurefreie Harn wird mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und (in einem langhalsigen Kjeldahlkolben auf dem Drahtnetze) drei Stunden lang gelinde gekocht, darauf wird die Lösung auf dem Wasserbade eingeeengt. Der Rückstand wird mittels normaler Natronlauge und möglichst wenig Wasser in einen 50 ccm-Meßkolben übergeführt und mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung und 2 g festem Baryumchlorid versetzt;

schließlich wird mit Wasser oder mit gesättigter Barytlösung bis zur Marke nachgefüllt.¹⁾

Nach Umschütteln und Stehenlassen ca. 15 Minuten wird durch einen trockenen Filter filtriert, und aus dem Filtrat werden 40 ccm (40 ccm Harn entsprechend) in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht. Die Lösung wird mit Salzsäure schwach angesäuert und außerdem werden noch 5 ccm normaler Salzsäure zugesetzt, worauf die Flüssigkeit durch Zutropfen von 20 ccm ca. $\frac{n}{3}$ -Silbernitratlösung entfärbt wird.²⁾ Nach Auffüllung mit kohlensäurefreiem Wasser wird filtriert, und aus 80 ccm des Filtrats wird das Ammoniak, wie unten (S. 137) näher erwähnt, ausgetrieben. Der Destillationsrückstand wird in Salzsäure gelöst, und die Lösung in einen 100 ccm-Meßkolben übergeführt, neutralisiert und übrigens auf ganz dieselbe Weise behandelt, wie es schon oben unter a) (S. 134) betreffs der Aminosäurebestimmung erwähnt worden ist. Zur Formoltitrierung werden 50 ccm der neutralisierten Lösung (16 ccm Harn entsprechend) verwendet. Die Differenz zwischen dem Aminosäurestickstoff nach und vor der Salzsäurebehandlung gibt die in 16 ccm Harn vorhandene, peptidgebundene Stickstoffmenge an.

Wenn die Hippursäuremenge klein ist oder es aus anderen Gründen bedeutungslos erscheint, die Menge derselben zu bestimmen, kann man selbstverständlich das oben erwähnte Ausschütteln mit Essigester unterlassen und den Harn direkt mit Salzsäure behandeln; in diesem Falle wird der Hippursäurestickstoff als peptidgebundener Stickstoff mit in Rechnung gezogen.

Um die Ammoniakdestillation möglichst einwandfrei ausführen zu

¹⁾ Besonders bei solchen Harnen, die nach der Salzsäurebehandlung reichliches Ammoniak enthalten, ist es sehr wichtig, daß die Lösung stark alkalisch reagiert und reichliches Baryumsalz enthält, denn sonst kann es geschehen, daß nicht alle Phosphorsäure gefällt wird.

²⁾ Siehe: S. P. L. Sørensen und H. Jessen-Hansen, Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 415 (1907). Wenn der Harn während der Salzsäurebehandlung nicht stark geschwärzt worden ist, kann die Entfärbung mit Silbernitrat unterlassen und die Abdestillation des Ammoniaks gleich vorgenommen werden.

können. ist es, besonders in solchen Fällen wie den letzterwähnten, wo eine große Ammoniakmenge abdestilliert werden soll, notwendig, auf einige Einzelheiten aufmerksam zu sein; wir werden deshalb unser Verfahren ein wenig ausführlicher, als es oben geschehen ist, besprechen.

Unser Apparat ist nach demselben Prinzip wie der von M. Krüger und O. Reich benutzte¹⁾ konstruiert. Unser Destillationskolben ist jedoch mit einem Scheidetrichter versehen und als Kühlapparat wenden wir einen verzinnten Metallkühler an, welcher über dem ersten Schenkel der als Vorlage dienenden Péligotschen Röhre angebracht ist. Die Vorlage, welche während der Destillation nicht gekühlt wird, wird mit zirka normaler Schwefelsäure beschickt und der auf dem zweiten Schenkel der Péligotschen Röhre angebrachte Destillieraufsatz wird mit der gleichen Säure gespült.

Nachdem die zu destillierende Lösung in den Kolben gebracht worden ist, wird durch den Scheidetrichter eine zirka halbnormale Lösung von Baryumhydroxyd in Methylalkohol zugesetzt.²⁾ Von dieser Lösung werden mindestens 10 ccm benutzt, die Menge richtet sich aber etwas nach der anwesenden Ammoniakmenge und muß so groß gewählt werden, daß nach der Abdestillation des Ammoniaks die Flüssigkeit einen deutlichen Überschuß an Baryumhydroxyd noch enthält.³⁾ Während der Destillation, welche bei dem durch eine gute Wasserstrahlpumpe erreichbaren Vakuum (ca. 15 mm Druck) ausgeführt werden muß, wird der Kolben in Wasser von 40° C. erwärmt und ein schwacher Strom von kohlenstofffreier Luft wird durch den Kolbeninhalt geleitet.

Wenn der Kolbeninhalt in lebhaftem Kochen gehalten und die Destillation beinahe bis zur Trockene geführt wird, ist eine einmalige Destillation gewöhnlich hinlänglich, um alles Ammoniak auszutreiben. Handelt es sich indessen um größere Ammoniakmengen (wie z. B. in mit Salzsäure gekochtem Harn), ist es notwendig, den Destillationsrückstand in ein wenig Salzsäure zu lösen und nach Zusatz vom Überschuß an methylalkoholischer Barytlösung noch einmal beinahe bis zur Trockene zu destillieren. Kontrollbestimmungen haben gezeigt, daß auf diese Weise, selbst wenn von mehr als 100 mg Ammoniakstickstoff die Rede ist, das Ammoniak so vollständig aus dem Harn abdestilliert werden kann, daß eine wiederholte Destillation nur 0,2 bis 0,4 mg Ammoniakstickstoff ergeben wird. Andererseits haben Kontrollbestimmungen, bei welchen reine

¹⁾ Abgebildet in dieser Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 170 (1903).

²⁾ Bei der Destillation sehr ammoniakreicher Lösungen benutzen wir eine gesättigte Lösung von Baryumhydroxyd in Methylalkohol.

³⁾ Wir erinnern hier an die bekannte Tatsache, daß phenolphthaleinhaltige Lösungen durch einen großen Basenüberschuß entfärbt werden können; die rote Farbe kommt aber beim Verdünnen oder bei Zusatz von unterschüssiger Säure wieder zum Vorschein.

Harnstofflösungen unter denselben Verhältnissen destilliert wurden, ergeben, daß eine ähnliche Ammoniakmenge (0,2 bis 0,4 mg Stickstoff entsprechend) durch die Zersetzung des Harnstoffs während der Destillation gebildet werden kann.

Wenn das abgetriebene Ammoniak quantitativ zu bestimmen war (dieses ist ja bei der Untersuchung des mit Salzsäure gekochten Harns nicht notwendig gewesen), haben wir den Inhalt der Pélignotschen Röhre und des Destillieraufsatzes in einen Kupferkolben für Kjeldahl-Destillationen gespült und das Ammoniak in üblicher Weise abdestilliert und jodometrisch bestimmt.

In unserer früheren Abhandlung¹⁾ haben wir einige Versuche angeführt, aus welchen es ersichtlich ist, daß die oben erwähnte Hippursäurebestimmung sehr gute Resultate liefert. Wir können nur beifügen, daß auch die Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge sowohl im Menschenharn wie auch im Hundeharn nach Brotfütterung sowohl nach der alten wie auch nach der modifizierten Methode zuverlässige und übereinstimmende Resultate gegeben hat. Nur die Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Hundeharn nach Fleischfütterung hat uns, wie schon oben öfters erwähnt, Schwierigkeiten bereitet; in solchen Fällen haben wir nur die modifizierte Methode anwenden können. Die dadurch erreichte Übereinstimmung zwischen Doppelanalysen desgleichen Harns ist, obwohl nicht eine ideale, so doch, wenn die vielen Manipulationen mit in Betracht genommen werden, eine zufriedenstellende zu nennen.

Zur Erläuterung werden wir das folgende Beispiel anführen: Eine größere Harnmenge von einem ausschließlich mit Fleisch ernährten Hunde wurde gesammelt und untersucht.

Der Stickstoffgehalt betrug 6,22%; 16 ccm Harn enthielten 28,64 mg Ammoniakstickstoff und 6,86 mg Aminosäurestickstoff.

Sieben Proben von je 50 ccm Harn wurden, wie oben angegeben, mit Salzsäure behandelt; der Aminosäurestickstoff in Milligrammen in 16 ccm Harn nach der Salzsäurebehandlung betrug in den sieben Versuchen:

11,76 — 11,82 — 11,28 — 11,20 — 12,04 — 11,90 — 12,04.

Der Unterschied zwischen dem größten und dem niedrigsten Wert ($12,04 \div 11,20 = 0,84$ mg) entspricht gerade 0,3 ccm $\frac{n}{6}$ -Natronlauge.

Schließlich mögen wir unter Bezugnahme auf das in diesem

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 37 (1909).

Abschnitte Angeführte nur betonen, daß es bei Formoltitrationen im Harne überhaupt und zwar besonders bei der Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge in harnstoffreichen Harnen von besonderer Bedeutung ist, auf die folgenden Punkte aufmerksam zu sein:

1. daß alle Phosphorsäure entfernt wird,
2. daß alles Ammoniak ausgetrieben wird, und
3. daß die Neutralisation mit Lackmuspapier als Indikator möglichst sorgsam ausgeführt wird.

III.

In einer früheren Abhandlung¹⁾ haben wir die formoltrimetrische Methodik mit besonderem Hinblick auf die Untersuchung normaler Harne sowie auch auf die Bedeutung der in solchen Fällen vorhandenen Fehlerquellen eingehend erwähnt. Aus dieser kritischen Besprechung haben wir den Schluß gezogen (l. c. S. 34), «daß die von uns zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren im Harne ausgearbeitete Methode wenigstens bei allen normalen Harnen vorzügliche Dienste leistet». Wie es in dem vorigen Abschnitte der gegenwärtigen Abhandlung nachgewiesen worden ist, spielt auch der durch den Ammoniakgehalt des Harns verursachte Fehler nur eine ganz untergeordnete Rolle und kann übrigens bei Anwendung der neuen Methode ganz beseitigt werden. Da außerdem diese letzterwähnte Fehlerquelle sowie ein paar andere kleine methodische Fehler, die in unserer früheren Abhandlung besprochen worden sind (l. c. S. 29 und S. 32), sich dadurch zu erkennen geben, daß die Formoltitrierungen ein wenig zu niedrig ausfallen, werden auch die durch unsere Methode gefundenen Aminosäuremengen im Harne als Minimalwerte zu betrachten sein. Wir glauben deshalb, daß es trotz der in der Einleitung (S. 121) erwähnten zweifelnden Äußerungen anderer Forscher als festgestellt betrachtet werden muß, daß normaler Harn, auch Menschenharn, nicht unwesentliche Mengen von Aminosäuren regelmäßig enthält.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 27 (1909).

Nachdem wir durch die Jagersche Beobachtung die Ursache der Schwierigkeiten kennen gelernt haben, die uns bei der Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im «Fleischharn» begegnet sind, und nachdem wir unser diesbezügliches Verfahren in zweckentsprechender Weise modifiziert haben, glauben wir die im vorigen Abschnitte beschriebene Methode zur quantitativen Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Harn, auch im «Fleischharn», empfehlen zu können. Es wird daher angebracht sein, hier einige Versuche näher zu besprechen, die wir ausgeführt haben, um über die Bedeutung der eventuellen Fehlerquellen bei diesem Verfahren ein Urteil gewinnen zu können.

Da die peptidgebundene Stickstoffmenge als die Differenz zwischen der Aminosäuremenge nach und vor der Salzsäurebehandlung des Harns bestimmt wird, kann die hier gestellte Frage auch folgenderweise formuliert werden: Werden durch die Salzsäurebehandlung des Harns nur die vorhandenen Polypeptide und andere Verbindungen, die peptidgebundenen Stickstoff enthalten (z. B. die Oxyproteinsäuren), gespalten, oder können auch andere Harnbestandteile in der Weise zersetzt werden, daß die Formoltitrierung und somit auch die Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge dadurch beeinträchtigt wird?

Wir haben diese Frage dadurch zu beantworten versucht, daß wir die Wirkung der Salzsäurebehandlung auf drei der wichtigsten Harnbestandteile, nämlich den Harnstoff, die Harnsäure und das Kreatinin untersucht haben. Der nach der Salzsäurebehandlung zurückgebliebene Eindampfungsrest wurde mit Wasser in einen 100 ccm-Meßkolben übergeführt und mit Baryumchlorid und Überschuß an Baryumhydroxyd versetzt, worauf mit Wasser bis zur Marke nachgefüllt wurde. Nach Umschütteln und viertelstündigem Stehenlassen wurde filtriert. 80 ccm des Filtrats wurden in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht und mit $\frac{n}{5}$ -Salzsäure und empfindlichem Lackmuspapier als Indikator genau neutralisiert. In 40 ccm der so gewonnenen neutralen Lösung wurde durch eine Formoltitrierung die gesamte formoltitrierbare Stickstoffmenge bestimmt, während

in anderen 40 ccm das Ammoniak im Vakuum in üblicher Weise abdestilliert und bestimmt wurde, worauf schließlich die formtitrierbare Stickstoffmenge in dem Destillationsrückstand, ganz wie oben erwähnt (S. 134), ermittelt wurde.

Tabelle V.

Der mit Salzsäure behandelte Stoff	Die Behandlung mit ca. 20% iger Salzsäure	Die gesamte, in 40 ccm Lösung anwesende, formtitrierbare Stickstoffmenge in mg	Die in 40 ccm Lösung vorhandene Ammoniakstickstoffmenge in mg	Die in 40 ccm Lösung nach Abdestillation des Ammoniaks noch anwesende formtitrierbare Stickstoffmenge in mg
1,5 g Harnstoff	zweimalige Eindampfung auf dem Wasserbade	4,98	5,05	0,00
	dreistündiges Kochen auf dem Drahtnetz und zweimaliges Eindampfen auf dem Wasserbade	44,41	44,65	0,03
0,5 g Harnsäure	zweimalige Eindampfung auf dem Wasserbade	0,00	0,20	0,00
	dreistündiges Kochen auf dem Drahtnetz und zweimaliges Eindampfen auf dem Wasserbade	0,00	0,13	0,00
0,5 g Kreatinin	zweimalige Eindampfung auf dem Wasserbade	0,64	0,20	0,56
	dreistündiges Kochen auf dem Drahtnetz und zweimaliges Eindampfen auf dem Wasserbade	1,06	0,35	0,78

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt. Man ersieht gleich, daß nur der Harnstoff in nennenswertem Grade durch die Salzsäurebehandlung gespalten wird; das einzige, die Formoltitrierung beeinflussende Spaltungsprodukt ist aber Ammoniak. Bei der Behandlung des Kreatinins scheint neben ein wenig Ammoniak auch eine geringe Menge einer anderen formoltitierbaren Substanz gebildet worden zu sein. Zieht man aber die kleinen Kreatininmengen in Betracht, die in dem zur Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge benutzten Harn vorhanden sind, ersieht man gleich, daß die hier berührte Fehlerquelle ohne irgend welche Bedeutung ist.

Wir glauben somit aussprechen zu dürfen, erstens, daß die in dem vorigen Abschnitte erwähnte Methode zur Bestimmung der peptidgebundenen Stickstoffmenge im Harn, auch im «Fleischharn», zuverlässige Resultate liefert, und zweitens, daß normaler Harn, auch Menschenharn, nicht zu vernachlässigende Mengen von peptidgebundenem Stickstoff regelmäßig enthält.¹⁾

Nachdem diese Arbeit beinahe vollendet war, erschien eine interessante Abhandlung von W. Frey und A. Gigon: «Über quantitative Bestimmung des Aminosäuren-N im Harn mittels Formoltitrierung».²⁾ Die genannten Forscher sind auf das anormale Verhältnis aufmerksam gewesen, welches Mischungen von Ammoniumsalzen und Aminosäuren bei der Formoltitration zeigen, und sie haben daher ein ähnliches Verfahren wie unsere modifizierte Methode zur Aminosäurebestimmung vorgeschlagen; nur wird das Ammoniak nicht im Vakuum abdestilliert, sondern durch einen kräftigen Luftstrom ausgetrieben. Übrigens gibt die Abhandlung eine schöne Bestätigung der von Sörensen durch Formoltitrierung einer Reihe von Aminosäuren und ähnlichen Verbindungen gewonnenen Resultate, die durch Mit-

¹⁾ Vgl. E. Abderhalden u. Fr. Pregl, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 19 (1905).

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XXII, S. 309 (1909).

heranziehung einiger nicht früher untersuchten Stoffe ergänzt werden.

Wir werden die Aufmerksamkeit der Verfasser nur auf einen Punkt lenken, nämlich auf die Frage, ob Barytlauge oder Natronlauge bei der Formoltitrierung vorzuziehen ist. Wie es aus der Hauptabhandlung Sörensens¹⁾ über die Formoltitrierung hervorgeht, ist es bei Untersuchung von carbonat- oder phosphalthaltigen Lösungen unzulässig, Natronlauge zu benutzen; man muß entweder mit Barytlauge titrieren oder, wenn möglich, noch besser die Kohlensäure und die Phosphorsäure durch Fällung mit Baryumchlorid und Barytlauge vor der Titrierung entfernen, erst darauf darf Natronlauge bei der Formoltitrierung verwendet werden. Bei unserer Versuchsmethodik wird der Harn vor der Formoltitrierung mit Baryumchlorid und Barytlauge vorbehandelt — eine ähnliche Behandlung mit Barytlauge findet auch bei dem Verfahren von Frey und Gigon statt —, deshalb, aber auch nur deshalb, ist es zulässig, sowohl bei dem Verfahren von Frey und Gigon, wie bei dem unsrigen, Natronlauge bei der Formoltitrierung zu benutzen.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. VII. S. 58 (1907).