

Bild 3
Veränderung der Molybdänblaufärbung mit der Zeit. I: im Dunklen gehaltene Probe; II: im Sonnenlicht gehaltene Probe

nach etwa 5 min ein Maximum erreicht wird. Dann folgt ein Abfall der Extinktionswerte, der zunächst schnell, dann langsamer vor sich geht, bis nach 20 min eine schwache stetige Abnahme der Extinktion einsetzt, die in dem zur Kolorimetrierung einer längeren Versuchsserie notwendigen Zeitraum eine befriedigende Konstanz zeigt. Ins direkte Sonnenlicht gebrachte Proben zeigen einen prinzipiell ähnlichen Verlauf ihrer Zeitkurve, nur daß die Abnahme der Extinktion mit der Zeit etwas größer ist. Es empfiehlt sich daher, die Proben im Dunkeln aufzubewahren, bis sie kolorimetriert werden.

Das photometrische Verfahren

Bei dem angegebenen Meßverfahren mit dem lichtelektrischen Lange-Kolorimeter genügt es im allg., wenn eine einmalige Verfahrenseichung durchgeführt wird, die zu einer ein für alle Male festgelegten Eichkurve führt. Bild 4 gibt eine solche Eichkurve für den Bereich von 0,000—0,150 mg P wieder. Bei der Konzentration 0,000 muß die

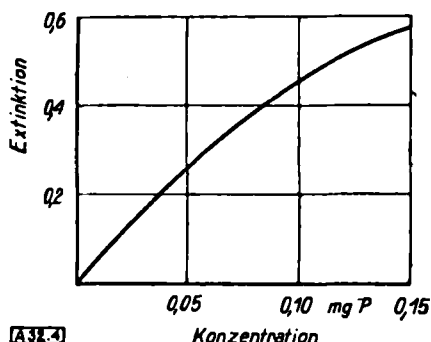


Bild 4
Beispiel einer Eichkurve zur kolorimetrischen P-Bestimmung

Kurve durch den Koordinatenanfangspunkt gehen, wenn die benutzten Reagenzien frei von P sind. Bei einem Wechsel der Reagenzien besonders bei Übergang zu Substanzen von geringerem Reinheitsgrad muß diese Bedingung sorgfältig nachgeprüft bzw. eine neue Eichkurve aufgestellt werden.

Für besonders wichtige Bestimmungen empfiehlt es sich, den in einem Vorversuch angenähert ermittelten P-Wert noch einmal in zwei Eichwerte einzugabeln, deren innerhalb der Fehlergrenze genaue Lage auf der Eichkurve die konstante Übereinstimmung aller Versuchsbedingungen mit den Bedingungen der Verfahrenseichung erweist. Für diesen Zweck sowie zur Ausführung der

Eichung selbst benötigt man eine Standardlösung mit bekanntem P-Gehalt. Feingepulvertes prim. Kaliumphosphat wird im Exsiccator über Schwefelsäure gründlich getrocknet. 0,4394 g davon werden in 1000 cm³ Wasser gelöst, das 33 cm³ konz. H₂SO₄ enthält. Diese Lösung enthält 0,1 mg P auf 1 cm³ und ist unbegrenzt haltbar. Zum alsbaldigen Verbrauch kann sie beliebig mit H₂O weiter verdünnt werden.

Für die Kolorimetrierung dient das Schott-Filter GG 11, das ein Durchlässigkeitsgebiet von 500—550 mμ an aufwärts hat und von 410 mμ an abwärts stark absorbiert¹⁰⁾. Um eine einzige Eichkurve für den ganzen Konzentrationsbereich zu erhalten, wurde eine mittlere Schichtdicke von 15 mm gewählt, wie sie die rechteckigen Trogküvetten des Kolorimeters besitzen. Als Meßmethode dient das von B. Lange als „Ausschlagmethode“ bezeichnete Verfahren¹¹⁾. Als photometrische Vergleichslösung wird eine Blindprobe benutzt, die bis auf die Abwesenheit des P-haltigen Materials alle Zusätze des Analysenganges enthält.

Arbeitsvorschrift zur Best. des Gesamt-P in Eiweißsubstanzen

Die Probe, die bis zu 0,15 mg P enthalten darf und im Mittel 10 mg Eiweiß enthalten kann, wird im Reagenzglas oder Mikro-Kjeldahlkolben mit 15 Tropfen konz. H₂SO₄ versetzt und auf dem elektrisch beheizten Sandbad erhitzt. Wenn alles H₂O verdampft ist, was am Auftreten von SO₂-Nebeln erkennbar ist, wird der Aufschluß vom Sandbad genommen und nach kurzem Abkühlen 1 Tropfen Perhydrol 30% (Merck) hinzugefügt. Darauf wird nochmals 30 min auf dem Sandbad weiter erhitzt. Der abgekühlte Aufschluß, der wasserklar und ungefärbt aussehen soll (andernfalls ist Perhydrol-Zugabe und Erhitzen zu wiederholen), wird in einen 100 cm³ Meßkolben übergespült und auf ein Volumen von etwa 50 cm³ gebracht. Dann versetzt man mit 1 Tropfen einer 1%igen wäßrigen α-Dinitrophenol-Lösung und läßt aus einer Bürette soviel 3 n Na-Acetat-Lösung hinzutropfen, bis ein schwacher gelber Farbton auftritt. Dazu sind etwa 4 cm³ erforderlich. Dann wird aufgefüllt bis etwa 80—85 cm³ Volumen und 2 cm³ Molybdänschwefelsäure (1 Teil 10%ige Ammoniummolybdat-Lösung + 3 Teile 18,4 n H₂SO₄) hinzugefügt. Es wird umgeschüttelt, mit 3 Tropfen frisch bereiteter SnCl₂-Lösung (1 g SnCl₂ p. a. in 10 cm³ konz. HCl unter vorsichtigem Erwärmen frisch gelöst) versetzt, sofort kräftig umgeschüttelt und bis zur Marke aufgefüllt. Dann wird die Probe 30 min ins Dunkle gestellt und photometriert. Als Bezugslösung dient ein Blindversuch, der farblos sein muß, wenn die verwandten Reagenzien frei von P sind.

Arbeitsvorschrift zur Best. des als Phosphat vorliegenden P

Die eiweißhaltige Lösung wird mit 2 cm³ Wasser verdünnt und darauf mit 2 cm³ 25%iger Trichloressigsäure versetzt. Es wird öfter umgeschüttelt, nach 30 min der Niederschlag abfiltriert und mit 2—3 cm³ Wasser nachgewaschen. Darauf wird das Filtrat + Waschwasser in einen 100 cm³ Meßkolben übergespült, auf etwa 80 cm³ aufgefüllt, mit 2 cm³ Molybdänschwefelsäure versetzt und dann weiter behandelt wie bei der ersten Vorschrift. Ist der P zwar nicht an Eiweiß wohl aber in anderer Form (Nukleinsäure) an organische Substanzen gebunden, die mit Trichloressigsäure nicht gefällt wird, so müssen Filtrat und Waschwasser der Trichloressigsäure-Fällung erst eingedampft und dann wie angegeben mit Schwefelsäure-Perhydrol aufgeschlossen werden.

Eingeg. 21. März 47. [A 32].

¹⁰⁾ Liste der Dichtewerte für Jenaer Farb- u. Filterglas, herausgegeben von Schott u. Gen. Jena.

¹¹⁾ B. Lange, Kolorimetrische Analyse, Berlin 1942, Verlag Chemie.

Über die Veraschungsdauer bei der Mikro-Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl

Von Dr. H. M. RAUEN und MARIANNE BUCHKA

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M.

Die Bestimmung des nicht an Sauerstoff gebundenen Stickstoffs organischer Verbindungen nach Kjeldahl ist ein heute unentbehrliches Verfahren. Nachdem vor etwa 20 Jahren eine Mikroausführung beschrieben und im Laufe der Zeit noch verbessert wurde, konnten auch kleinste Substanzmengen mit hinreichender Genauigkeit analysiert werden.

Mit dem Fortschritt der Eiweißchemie wurde auch die Mikro-N-Bestimmung immer wieder überprüft. Die meisten Kritiken betreffen den ersten Teil des Bestimmungsverfahrens, die Veraschung, während die Bestimmung des Ammoniaks nach dem Destillationsverfahren oder durch „Neblerisation“ heute

kaum noch Probleme sein dürften. So wurde wiederholt darauf hingewiesen, daß es beim Aufschluß trotz des großen Überschusses an konz. Schwefelsäure zu N-Verlusten kommen kann. Ein Teil des Gesamt-Stickstoffs soll in Form von Methylamin¹⁾ oder anderen Aminen²⁾ und elementarem Stickstoff³⁾ in den Veraschungsabgasen nachgewiesen worden sein. Von verschiedenen Autoren wurde angegeben, daß Stickstoff-Verluste bei der Veraschung von Lysin, Tryptophan und Tyrosin eintreten, die u. U.

¹⁾ H. J. Fuchs, Klin. Wschr. 9, 1890 [1930].

²⁾ R. A. Gortner u. W. F. Hoffmann, J. biol. Chemistry 70, 457 [1926].

³⁾ J. P. Peters u. D. D. Van Slyke: Quantitative Clinical Chemical Methods, S. 519. Baltimore 1932.

10–27% betragen können^{4, 11}). Andere Aminosäuren lassen dagegen eine glatte, verlustfreie N-Analyse zu.

Man hat versucht, den Aufschluß durch Zugabe von katalytisch wirksamen Metallen oder Metallsalzen oder durch Zusatz von oxydierenden Verbindungen zu beschleunigen. Bei Gebrauch des früher ausschließlich benutzten Katalysators Quecksilber soll der Verlust an N vermeidbar sein⁵). Osborne⁶) gebrauchte noch das Makroverfahren mit 0,1 g Protein, 20 cm³ konz. Schwefelsäure, 1 Tropfen Quecksilber, und erhitzte noch 4–5 h nach Farbloswerden der Reaktionsmischung weiter. Zur Beendigung des Aufschlusses wurden dann einige Krystalle Kaliumpermanganat zugefügt und nochmals erhitzt. Sørensen⁷) benutzte 20 mg Protein, 20 cm³ konz. Schwefelsäure, 5 g Kaliumsulfat und 50 mg Kupferdraht als Katalysator. Er benötigte 2–4 h Erhitzen bis zur Klärung des Gemisches, dann weitere 5 h zur Weiterführung des Aufschlusses, und gab schließlich in die noch kochende Flüssigkeit 1,5 g trocknes gepulvertes Kaliumpermanganat in drei Anteilen. Nach diesen beiden Vorschriften werden erhebliche Zeitspannen bis zum vollständigen Aufschluß benötigt. Sie lassen sich wesentlich verkürzen, wenn Selen, Selendioxyd oder Selenate als Katalysatoren angewandt werden^{8, 9}). Noch besser wirkt ein Gemisch von Se und HgCl₂⁹). Die Veraschung ist dann nach 1 h Weitererhitzen nach Klarwerden beendet. Nach Robinson und Mitarb.¹⁰) genügen sogar 20 min, wenn SeOCl₂ als Katalysator gebraucht wird. Längeres Erhitzen des Veraschungsgemisches mit Se-Katalysatoren führt nach einigen Autoren wieder zu Stickstoff-Verlusten, während andere erst korrekte Werte bei länger dauerndem Aufschluß erhalten⁹). Wahrscheinlich muß für jedes Protein bzw. jedes N-haltige Produkt die günstigste Katalysatormischung und die optimalste Veraschungsdauer ausprobiert werden⁹).

Trotz dieser Verbesserungen ist noch keine befriedigende Übereinstimmung zwischen den N-Werten für Eiweißkörper festzustellen. Wie neuerdings Chibnall und Mitarb.¹¹) mitteilen, beruht dies darauf, daß die meisten Untersucher modifizierte Bestimmungsverfahren anwenden ohne die Abweichungen genau zu beschreiben, ferner, daß gereinigte Eiweißkörper eine gewisse Hygroskopizität besitzen und die Analysen auf den lufttrocknen und nicht den völlig trocknen Zustand berechnet werden. Schließlich werden auch bei den mit Katalysatoren durchgeführten Aufschlüssen Lysin, Tyrosin und Tryptophan nicht völlig verascht, wodurch bei Anwendung kürzerer Veraschungszeiten Fehler auftreten. Die genannten Autoren geben an, daß ein vollständiger Aufschluß nur dann angenommen werden kann, wenn 5 g eines Katalysatorgemisches, bestehend aus 80 g Kaliumsulfat, 20 g Kupfersulfat und 34 mg Na-selenat pro Ansatz angewandt werden. Der Ansatz enthält Protein mit 10–15 mg N, 20 cm³ konz. Schwefelsäure und zunächst 5 cm³ Wasser. Es soll mindestens 8 h nach Klärung am leichten Sieden erhalten werden. Den

schweren Aufschluß von Lysin beschrieben auch Van Slyke und Mitarb.¹²). Mit einem Präparat von d,l-Lysin-HCl erhielten Chibnall und Mitarb. theoretische Gesamt-N-Werte unter den genannten Aufschlußbedingungen, jedoch bei 12stündigem Erhitzen auf einem elektrischen Heizkörper. Mit Gasbrennern wurden nur 95–100% wiedergefunden. Mit einem Zusatz von HgCl₂ zur angegebenen Katalysatormischung (32 mg/g) wird der theoretische Wert schon in 4–5 h erreicht, in 2 h dagegen nur 98,5%¹³). Danach wird empfohlen, bei Anwesenheit von Lysin (und auch Histidin) in Proteinen den Aufschluß zur N-Bestimmung mindestens 8 h nach Klarwerden fortzuführen.

Diese Veraschungszeit, trotz des Zusatzes von katalysierenden Agenzien, erschien uns nach unseren seitherigen Erfahrungen zu lang und wir haben diese Angaben überprüft.

Wir legten jeweils die gleichen Mengen von Lysin, Eiweißhydrolysaten oder Proteinen vor, fügten je 2 cm³ konz. Schwefelsäure hinzu, die pro 100 cm³ 0,7 g SeO₂ enthält, und zur Verhinderung des völligen Verdampfens der Schwefelsäure noch 0,5 g KHSO₄ und erhitzen jeweils 2 Ansätze für bestimmte Zeiten, d. h. 1 h, 2, 4, 6 und 8 h nach Klarwerden der Aufschlußmischungen über Gasbrennern. Die Werte der Tabelle sind jeweils Mittelwerte aus zwei innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmenden Doppelbestimmungen. Die Angaben erfolgen in cm³ n/100 Schwefelsäure, die bei der Bestimmung des NH₃ in einem modifizierten Apparat nach Parnas-Wagner verbraucht wurden und also der NH₃-Menge äquivalent sind.

Versuchslösung	Veraschungsdauer				
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Lysin-HCl	8,42	8,46	8,49	8,42	8,36
Lysin-HCl	6,46	6,45	6,45	—	6,46
Lysin-HCl	6,06	6,06	6,08	6,08	6,07
Lysin-HCl	9,66	9,67	9,64	—	9,61
Lysin-HCl	6,12	6,12	6,09	6,05	—
Lysin-HCl	4,31	4,32	4,30	4,28	4,28
Lysin-HCl	7,92	7,93	7,90	7,90	7,84
Histidin-HCl	3,71	3,70	3,68	3,68	3,71
Arginin-HCl	4,73	4,74	4,72	4,74	4,74
Gelatinehydrolysat	5,12	5,11	5,12	5,07	5,02
Gelatinehydrolysat	9,60	9,58	9,60	9,58	9,56
Caseinhydrolysat	13,08	13,07	13,08	13,07	13,06
Caseinhydrolysat	7,80	7,80	7,80	7,79	7,80
Edestin	3,12	3,10	3,12	3,08	3,06
Edestin	9,32	9,30	9,30	9,30	9,28
Clupein C	4,25	4,25	4,25	4,26	4,25
Clupein C	7,58	7,60	7,60	7,58	7,58

Tabelle 1
Versuche über die notwendige Veraschungsdauer beim Ges.-N nach Kjeldahl (Mikroverfahren). Angaben in n/100 Schwefelsäure

Man sieht aus allen Versuchsreihen der Tabelle 1, daß eine Aufschlußzeit von 1 h nach Klarwerden des Reaktionsgemisches ausreichend ist, daran feststellbar, daß durch Verlängerung der Veraschungszeit keine Zunahme des NH₃ eintritt. Vielmehr lassen einige Versuchsreihen erkennen, daß bei fortgesetztem Erhitzen eine geringe Abnahme des NH₃ eintritt¹⁴). Wir schließen aus diesen Versuchen, daß beim Mikro-Kjeldahl, entgegen den Befunden von Chibnall und Mitarb., eine Aufschlußdauer von 1 h nach Klarwerden der Ansätze bei Verwendung von „Selen-Schwefelsäure“ (0,7% SeO₂) ausreichend ist, auch wenn Lysin oder lysinhaltige Proteine vorliegen.

Eingeg. am 10. März 1948. [A 95]

¹¹) Vgl. hierzu N. Weißmann u. R. Schönheimer, J. biol. Chemistry 140, 779 [1941].

¹²) Vgl. die entsprechenden Ergebnisse von S. M. Patel u. H. Sreenivasan⁹).

Zuschriften

Bestimmung von SO₂ und H₂S mittels Kaliumpermanganat

Von Dr. ERICH BOYE und EUGEN GRANER, Darmstadt.

Unter obigem Titel veröffentlichte F. Petio in dieser Zeitschrift¹) eine Arbeit, in der die bis dahin übliche Methode der Bestimmung mit Jod-Lösungen als überflüssig ersachtet wurde. An Stelle des Jods tritt KMnO₄. Es wäre dies ein höchst erwünschter Austauschstoff, da es an Jod in Deutschland überall fehlt. Uns interessierte nur die Bestimmung des H₂S und zwar in Kokereigasen, und wir haben daher die neue Methode anzuwenden versucht. Nach der bisher üblichen Analysenmethode wurde der H₂S als CdS gebunden und der aus diesem in angesäuerter Jod-Lösung wieder freigemachte H₂S durch den Jod-Verbrauch bestimmt.

Nach Petio wird das CdS nach Filtration durch ein Schwarzbandfilter und Auswaschen zusammen mit dem Filter in einem Erlenmeyer-Kolben mit

¹) Diese Ztschr. 64, 59 [1941].

n/2 oder n/10 KMnO₄-Lösung erhitzt, worauf dann die gleiche Menge n/2 oder n/10 Schwefelsäure zugefügt und geschüttelt wird. Dann wird in der Siedehitze mit Na-Oxalatlösung zurücktitriert.

Die eingehende Nachprüfung dieses Verfahrens führte zu folgenden Erkenntnissen: Grundsätzlich falsche Ergebnisse ergibt schon allein die Tatsache, den CdS-Niederschlag mit dem Filter der Oxydation zu unterwerfen. Cellulose reduziert schon in der Kälte eine KMnO₄-Lösung und in noch viel höherem Maße in der Wärme und in schwefelsaurer Lösung. So ergab denn auch die Behandlung einer gleichen Menge CdS-Niederschlag mit KMnO₄-Lösung mit Filter einen 4-mal so großen Verbrauch an Oxydationsmittel als ohne Filter. Es wurden auch verschiedene Filtersorten allein mit KMnO₄-Lösung behandelt und ergaben in schwefelsaurer Lösung stark unterschiedliche