

217 m $\mu$  einem einfach  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Lacton entspricht, dasjenige bei ca. 308 m $\mu$  einer Carbonylgruppe.

2.  $\alpha$ -Antiarin gab ein kryst. Tribenzoat, das bei der Dehydrierung mit CrO<sub>3</sub> einen kryst. Neutralstoff lieferte; trotzdem ist die Anwesenheit einer Aldehydgruppe nicht ausgeschlossen.

3.  $\alpha$ -Antiarin liess sich mit Na-amalgam zum al-Dihydro- $\alpha$ -antiarin reduzieren, das im Ultraviolett noch die für  $\alpha, \beta$ -unge-sättigte Lactone typische Absorption besass und biologisch etwa gleich stark wirksam war wie  $\alpha$ -Antiarin. Es lieferte ein kryst. Tetra-benzoat, das bei der Dehydrierung mit CrO<sub>3</sub> unter Verlust von 2 H-Atomen einen Neutralstoff lieferte.  $\alpha$ -Antiarin enthält somit eine bei Raumtemperatur nicht benzoxylierbare sekundäre HO-Gruppe.

4. Nach der hydrolytischen Spaltung von  $\alpha$ -Antiarin mit HCl in Aceton nach Mannich und Siewert konnte eine kleine Menge eines kryst. Stoffes isoliert werden, der wahrscheinlich Antiarigenin darstellt; er lieferte ein kryst. Monobenzoat. Aus den amorphen Mutterlaugen konnte ein anderes kryst. Benzoat erhalten werden, das wahrscheinlich ein Anhydro- $\alpha$ -antiarin-tribenzoat war.

5. Die zuckerfreien Anteile der analogen Spaltung des al-Dihydro- $\alpha$ -antiarins gaben erst nach Benzoxylierung Krystalle. Ihre Analyse passte auf ein al-Dihydro-antiarigenin-dibenzoat.

6. Antiarose, die Zuckerkomponente des  $\alpha$ -Antiarins, konnte als D-Gulomethylose identifiziert werden, die damit zum ersten Male in einem Naturprodukt nachgewiesen wurde.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 101. Über eine Semimikro-*Kjeldahl*-Bestimmung des Aminosäure-Stickstoffes

von G. Frey.

(18. II. 48.)

Anlässlich des Studiums von  $\alpha$ -Aminosäuren wurde die Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* in unserem Laboratorium neu ausgearbeitet. Für die uns gestellten Aufgaben hat sich der Semimikro-Masstab (1—2 mg N pro Destillation) als praktisch erwiesen.

Um die ursprüngliche *Kjeldahl*'sche Methodik<sup>1)</sup> und ihre apparativen Modifikationen nach I. K. Parnas und R. Wagner<sup>2)</sup> den Anforderungen des Betriebes anzupassen, wurde speziell die Destillationsapparatur für eine zweckmässige Arbeitsweise umgebaut. Dabei bietet die Verwendung von Wasser mit *Tashiro*-Reagens als

<sup>1)</sup> Z. anal. Ch. 22, 366 (1883).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. 125, 253 (1921) und Z. anal. Ch. 114, 261 (1938).

Vorlage, die elektrische Dampferzeugung sowie die Einstellung der 0,02-n.  $H_2SO_4$  mittels Ammonsalzen besondere Vorteile, ohne die erreichbare Genauigkeit einzuschränken.

Es muss noch vorausgeschickt werden, dass die in diesem Bericht beschriebene Methodik für die  $\alpha$ -Aminosäuren spezifisch ist. Andere Substanzen führen wieder zu anderen Modifikationen der immer vielseitiger gebrauchten *Kjeldahl'schen* Stickstoffbestimmungsmethode.

## Experimenteller Teil.

### 1. Beschreibung der Apparaturen.

a) Das Aufschlussgestell: — In der vielseitigen Literatur über die *Kjeldahl*-Methodik sind genaue Angaben über die Beschaffenheit des Veraschungsgestelles selten. Es soll deshalb hier etwas näher darauf eingegangen werden.

Unser Gestell ist eine Modifikation des Modелles nach *Pregl*<sup>1)</sup>. Die Absaugvorrichtung aus Glas wurde durch Bleiröhren ersetzt. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, ist diese „Veraschungseinheit“ zur Aufnahme von 6 bzw. 11 Veraschungskolben zu 100 cm<sup>3</sup> vorgesehen. Um eine maximale Wärmeausnutzung zu erzielen, liegen die Veraschungskolben in genau angepassten V2A-Stahlschalen. Als Heizquelle wurden gewöhnliche *Bunsen*-Brenner verwendet, die nur die vordere 6-er Reihe der Kolben aufheizen. Durch indirekte Heizung kann man auf der hinteren 5-er Reihe bereits eine Anzahl Analysen soweit eindampfen und vorveraschen, dass sie nach dem Freiwerden der vorderen Reihe ohne Zeitverlust sofort weiter verascht werden können. Diese Anordnung hat die Notwendigkeit eines zweiten Bleirohrs als Absaugvorrichtung mit sich gebracht. Die 2 Bleiröhren werden mit gewöhnlichen Wasserstrahlpumpen verbunden. Diese Absaugvorrichtung hat sich sehr gut bewährt, was jedoch eine gute Ventilation in der Veraschungskapelle nicht ausschliesst. Zur Entfernung des Kondensates aus den Bleiröhren wird der Röhrenaufschwung um ca. 10 mm auf einer Seite erhöht.

Die Verwendung eines nichtrostenden Stahls (V2A oder V4A) für die 0,5 mm-dicken Schalen ist zu empfehlen (nach einem ca. 2-jährigen ständigen Gebrauch haben die verwendeten Schalen keine grosse Abnutzung aufgewiesen). Als Bodenplatte wird eine 3 mm-dicke Eisenplatte verwendet. Die auf der Fig. 1 gezeigte Verschalung, die zur Zeit der Gasknappheit angebracht wurde, erwies sich später hinsichtlich des Schutzes gegen starke Wärmeausstrahlung, Erhöhung der Wärme unter der Bodenplatte, besonders der hinteren Reihe, als sehr praktisch.

Infolge der Beweglichkeit des Gestelles, auf welchem die 2 Bleiröhren liegen, kann man diese durch Lösen der 2 Flügelschrauben für die Verwendung von 100er, sowie 50er *Kjeldahl*-Kolben einstellen.

Die Gleichheit und die Regelmässigkeit der 6 *Bunsen*-Brenner spielt eine besondere Rolle, die man zur Erzielung reproduzierbarer Resultate nicht unterschätzen darf. Sind alle 6 Brenner im Gebrauch, so kann man eine Wassermenge von 10 cm<sup>3</sup> (mit Zusatz von 2 cm<sup>3</sup>  $H_2SO_4$  konz. und 3 Perlen) auf der vorderen Reihe innerhalb von 7 Minuten, und auf der hinteren Reihe innerhalb von 12½ Minuten eindampfen.

b) Die Destillationsapparatur: — Die verwendete Destillationsapparatur ist in Fig. 2 wiedergegeben und besteht im Prinzip aus denselben Teilen wie diejenige von *Parnas* und *Wagner*<sup>2)</sup>. Eine wesentliche Modifikation stellt die Einführung der ausschliesslich elektrischen Dampfentwicklung dar. *L. Miller* und *J. A. Houghton*<sup>3)</sup> haben die Dampferzeugung ebenfalls durch einen Heizdraht bewerkstelligt, ohne jedoch auf den *Bunsen*-Brenner zu verzichten.

Als Dampfentwickler wird ein 500 cm<sup>3</sup> Jenaer „*Keller*-Dreihals-Sulfierkolben“ verwendet. Der Durchmesser des zentralen Halses beträgt ca. 55 mm und derjenige der

<sup>1)</sup> *F. Pregl* und *H. Roth*, Die quantitative organische Mikroanalyse, 4. Aufl. (1935), S. 108.      <sup>2)</sup> Siehe *Pregl*, loc. cit., S. 107.      <sup>3)</sup> *J. Biol. Chem.* **159**, 373 (1945).

Seitenhälse 18—20 mm. Mittels eines dicken, gut ausgekochten Gummistopfens wird ein Tauchsieder von 750 Watt in den *Keller*-Kolben fixiert. In einer zweiten Bohrung des Stopfens wird ein Sicherheitsventil angebracht.

Die zwei Seitenhälse dienen zur Wasserzufuhr, resp. Dampfentnahme. Als Wasserquelle wurde eine mit destilliertem und aufgekochtem Wasser gefüllte 5—10 Liter Vorratsflasche verwendet. Diese steht auf einem um mindestens 40 cm überhöhten Gestell. Eine regelmässige Wasserzufuhr wird durch einen Quetschhahn kontrolliert. Verfügt man über ein gut enthärtetes Fabrikwasser, so kann man den Dampfentwickler mittels eines Druckreduzierventils direkt an die Wasserleitung anschliessen.

Nach Beendigung einer Destillation und Entfernung der Vorlage wird der Destillationskolben mittels Vakuum einer Wasserstrahlpumpe nach *St. Zb. Bartosiewicz*<sup>1)</sup> entleert. Die Dampfentwicklung ist kontinuierlich und während des Einfüllens der nächsten Analysenlösung wird der Dampf durch das Entleerungsrohr in die Wasserstrahlpumpe umgeleitet.

Alle Gummiverbindungen sind so kurz wie möglich und aus gutem, ausgedämpftem Material hergestellt. Die Verbindung Schaumkugel-Silberkühlrohr wird bündig, Metall auf Glas gemacht.

Die mit dem 750 W-Tauchsieder entwickelte Dampfmenge ist konstant und entspricht, für eine Destillationsdauer von 1½ Minuten, einer Kondensatmenge von 20 cm<sup>3</sup>. Der Wasserverbrauch beträgt ca. 1,2 Liter pro Stunde. Die hohe Wattzahl des Tauchsieders ermöglicht das Aufheizen der Wassermenge im Dampfentwickler (ca. 350 cm<sup>3</sup>) von Zimmertemperatur auf Siede-Temperatur innerhalb von 3 Minuten 15 Sekunden.

Die höchstzulässige Flüssigkeitsmenge, die man in den Destillationskolben einfüllen kann, beträgt (NaOH inbegriffen) 35 cm<sup>3</sup>.

Die Kühlung des Silberrohres muss entsprechend der grossen Dampfmenge gut sein. Da die Temperatur des Kondensates eine Rolle spielen kann, wurde diese durch den Durchfluss von ca. 90 Liter Kühlwasser pro Stunde (Leitungswasser) durch den Kühlmantel auf ca. 19° C gehalten.

Die abgebildete Destillationsapparatur ist sehr leistungsfähig und ein geschickter Laborant kann mit etwas Übung mehr als 200 Destillationen im Tag ausführen.

Die weiter unten angegebene Destillationszeit von 1½ Minuten wurde an Hand von zahlreichen Versuchen ermittelt. Eine 4 mg N entsprechende Ammoniakmenge wurde in dieser relativ kurzen Zeit ohne Verlust abdestilliert. Anderseits ist eine minimale Destillationsdauer von 1 Minute erforderlich, um eine 1 mg Ammoniak-N-Menge abzudestillieren. Die Zeit der Destillation wird vom Moment des Dampfeintrittes in die obere Schaumkugel an berechnet. Die Flüssigkeitsmenge im Destillationskolben variiert normalerweise zwischen 20 und 25 cm<sup>3</sup> (inklusiv 10 cm<sup>3</sup> NaOH).

## 2. Experimentelles.

### a) Reagenzien:

- Schwefelsäure: rein konz. 98-proz.
- CuSO<sub>4</sub>—Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung: eine wässrige Lösung von 40 g CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O „Analar“ und 40 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhydr.) *Merck* pro Liter.
- NaOH 40-proz. (Gew. %): puriss. *Siegfried*.
- KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch: 95 g feinpulverisiertes KMnO<sub>4</sub> reinst *Merck* + 5 g Selen reinst, gefällt, *Kahlbaum*.
- Tashiro-Reagens: Ein Gemisch aus 100 cm<sup>3</sup> einer 0,03-proz. alkoholischen Methylrotlösung + 15 cm<sup>3</sup> einer 0,1-proz. alkoholischen Methylenblaulösung.
- Wässrige Lösung für die Vorlage: Auf 2 Liter gekochtes dest. Wasser 20 cm<sup>3</sup> Tashiro-Reagens. Die blass rosa-violette Färbung der Lösung wird durch Zusatz von 0,5—1 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02-n. hergestellt.
- Schwefelsäure 0,02-n.: durch Verdünnung einer 0,1-n. Lösung.

<sup>1)</sup> Bioch. Z. 289, 55 (1937).

b) Einstellung der Schwefelsäure 0,02-n.: Die  $H_2SO_4$  wurde direkt durch Titration bekannter  $NH_4OH$ -Mengen eingestellt, die durch alkalische Destillation genau abgewogener Ammonsalzmengen erzeugt wurden. Vorerst musste der Blindwert oder Leerwert der Apparatur (Destillation+Titration) bestimmt werden. Dieser Wert wurde dann von jedem Resultat abgezogen.

Als Testsubstanzen verwendeten wir: Ammonsulfat pro anal. *Kahlbaum*, Ammonsulfat pro anal. „*Analar*“, Ammonchlorid pro anal. „*Analar*“, Ammonoxalat pro anal. *Merck*.

Die drei ersten Substanzen wurden eine Nacht lang in der Trockenpistole (Alkoholfüllung) über  $P_2O_5$ , das Ammonoxalat bei Zimmertemperatur über  $P_2O_5$  im Vakuumexsikkator getrocknet.

Von jeder Ammonverbindung wurde eine Lösung hergestellt, die ca. 0,2 mg N pro  $cm^3$  enthielt. Von diesen Lösungen wurden je 1, 2, 3, 5, 10  $cm^3$  abdestilliert und titriert. Nach Abzug des Blindwertes wurden alle Resultate auf eine Basis von 5  $cm^3$  (= ca. 1 mg) umgerechnet und ein Mittelwert aus den 4 Testlösungen (ca. 45 Einzelbestimmungen) ermittelt. Der Faktor der  $H_2SO_4$ , die für diese Versuche (Tabelle) verwendet wurde, war z. B. 1,0263.

Zur weiteren Kontrolle wurden die verschiedenen Test-Lösungen mit  $H_2SO_4$  konz. angesetzt und wie gewöhnliche Analysen aufgeschlossen. Die Resultate, nach Abzug des Veraschungsblindwertes, stimmten mit den Testresultaten überein.

Da die abdestillierte  $NH_4OH$ -Menge direkt mit  $H_2SO_4$  0,02-n. titriert wird, kann man mit einem Multiplikationsfaktor die Anzahl verbrauchter  $cm^3 H_2SO_4$  0,02-n. direkt in mg N ausdrücken. Der für das oben erwähnte Beispiel gefundene Multiplikationsfaktor betrug 0,2875. Die erhaltenen Testkurven sind für alle 4 Substanzen Geraden, die durch den Koordinatennullpunkt gehen.

Zur Kontrolle der oben erhaltenen Resultate und Faktoren wurde die  $H_2SO_4$  0,02-n. noch nach dem gewöhnlichen acidimetrischen Verfahren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden genaue 0,02-n.-Lösungen von  $KHCO_3$  und  $Na_2B_4O_7$ , 10  $H_2O$  hergestellt.  $KHCO_3$  p. anal. *Merck* und *Kahlbaum* wurden eine Nacht über  $P_2O_5$  im Vakuumexsikkator getrocknet und Borax nach der Methode von *F. H. Hurley jr.*<sup>1)</sup> umkristallisiert und getrocknet. Der sich aus 9 Titrationen ergebende Faktor der  $H_2SO_4$  0,02-n. war 1,0263. Als Indikator wurde wie bei der Ammoniakdestillation *Tashiro*-Reagens (siehe *R. Freseius*<sup>2)</sup>) verwendet. Die Zuverlässigkeit der Einstellung der 0,02-n.  $H_2SO_4$  mit Ammonsalzen wird damit bestätigt.

Zur Prüfung der hier beschriebenen Semimikro-*Kjeldahl*-Methode wurden folgende Aminosäuren verwendet:

D, L- $\alpha$ -Alanin, D, L-Norleucin, L(+)-Glutaminsäure, L(+)-Lysin, HCl, D, L-Methionin, L(+) Histidin, HCl,  $H_2O$  von *Merck and Co. Rahway N.Y.*, „C.P.-Grade“-Produkte; L(-)-Tryptophan „C.P.“, D, L-Phenylalanin, L(-)-Leucin „C.P.“, D, L-Isoleucin „C.P.“, L(-)-Cystin „C.P.“, L(-)-Prolin „C.P.“, D, L-Threonin „C.P.“ von *Pfanstiehl Chemical Co.* Waukegan, Illinois; ferner: D, L-Valin, D, L-Serin, D, L-Asparaginsäure, L(+)-Arginin, HCl von *The General Biochemical Inc.*, Chagrin Fall, Ohio; L(-)-Tyrosin von *Hoffmann-La Roche*, Basel; L(-)-Methionin<sup>3)</sup>.

Jede Aminosäure wurde in der Trockenpistole (Alkoholfüllung) über  $P_2O_5$  bis zur Gewichtskonstanz (16—24 Stunden) getrocknet.

Ein Teil der Probe wurde für die Semimikro-*Dumas*-N-Bestimmung verwendet (Einwage je nach Aminosäure 20—60 mg). Zur N-Bestimmung nach *Kjeldahl* wurden von jeder Aminosäure 2 Lösungen (Einwage 50—120 mg/100  $cm^3$ ) mit Zusatz von 1—2 Tropfen HCl konz. hergestellt.

<sup>1)</sup> Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **8**, 220 (1936).

<sup>2)</sup> Z. anal. Ch. **114**, 275 (1938).

<sup>3)</sup> Wir danken Herrn Dr. K. Vogler von der *Aligena A.G.*, Basel, für die freundliche Überlassung dieses Kontrollpräparates.

Tafel I.

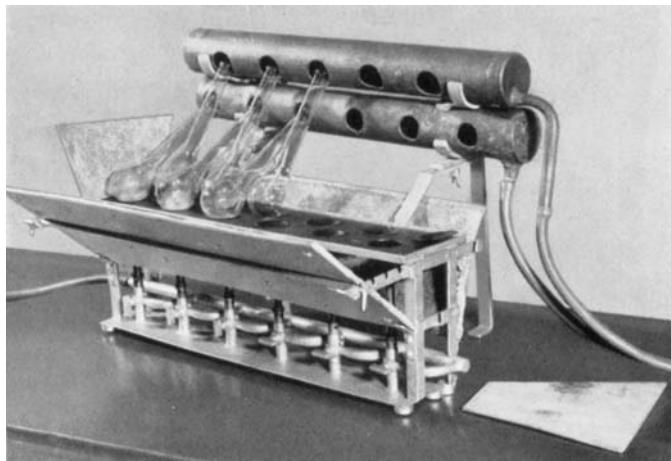


Fig. 1.  
(Länge der vorderen Kante = 55 cm)

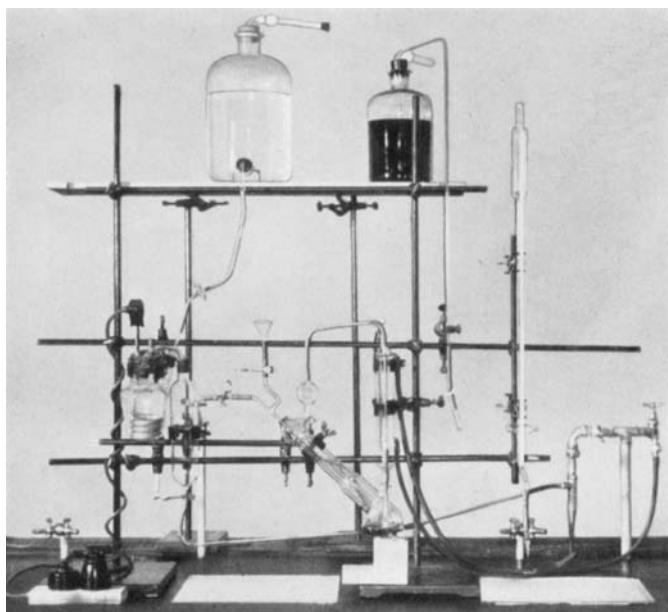


Fig. 2.

Planche II.

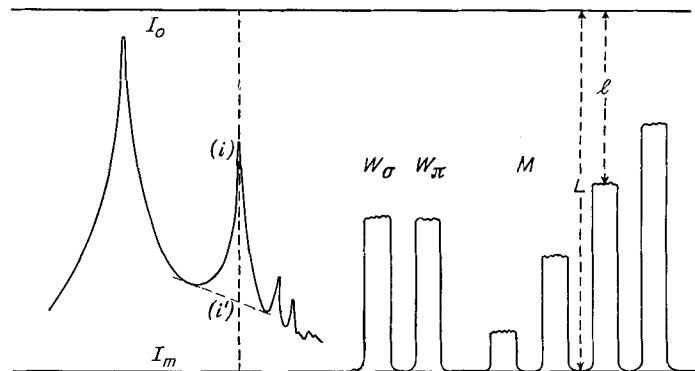


Fig. 2.

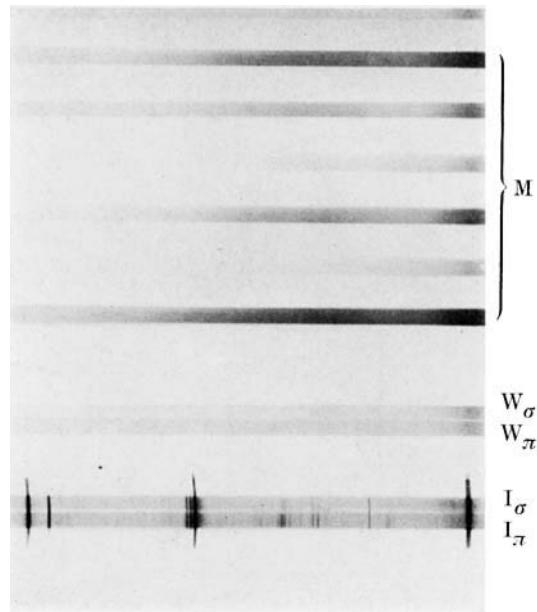


Fig. 3.

Planche I.

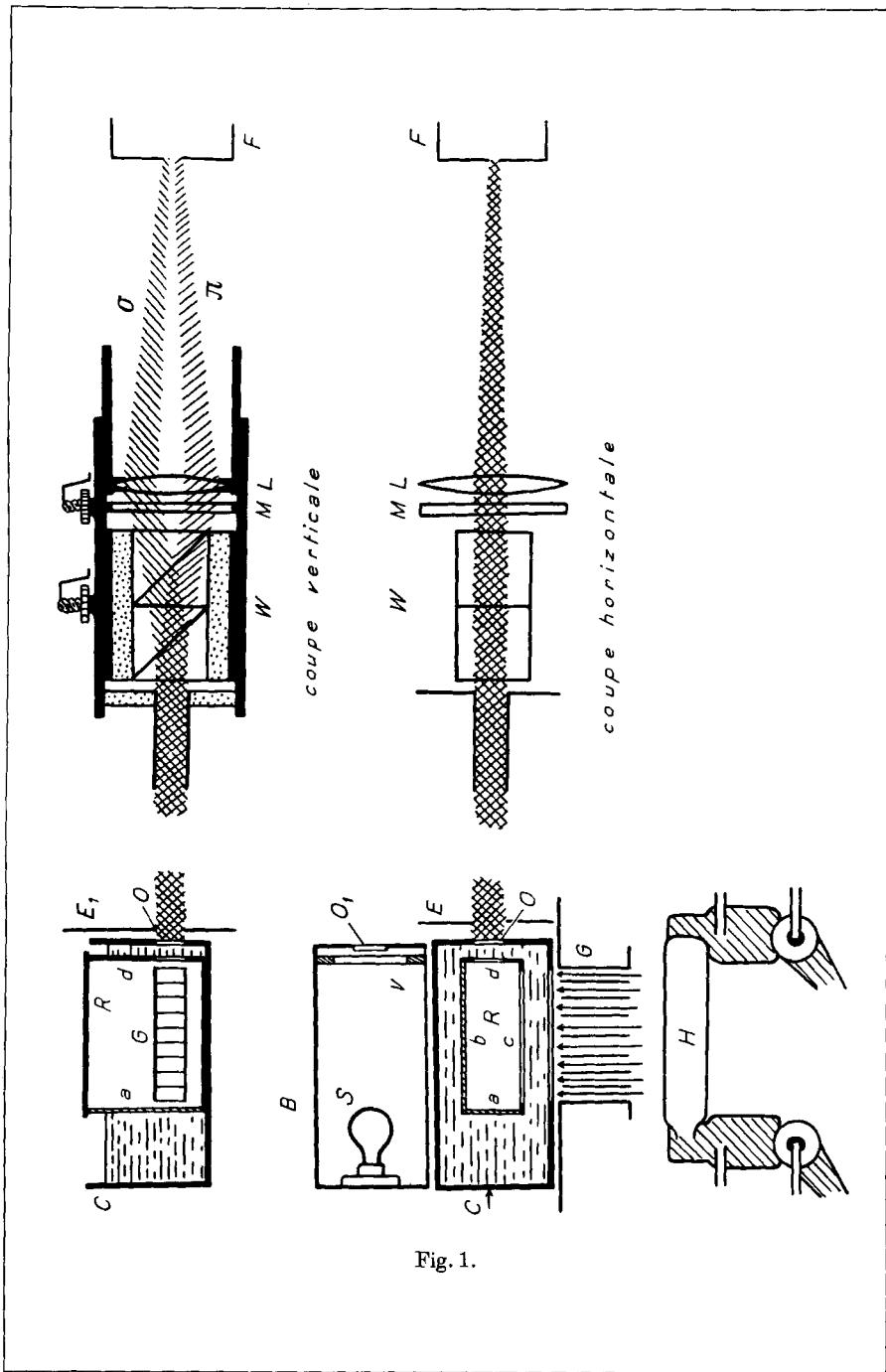


Fig. 1.

Für die eigentlichen *Kjeldahl*-Bestimmungen wurden von jeder Lösung mindestens 2 mal 5 cm<sup>3</sup> und 2 mal 10 cm<sup>3</sup> angesetzt.

### c) Ausführung der Stickstoffbestimmung.

**Ansetzen:** Das Ansetzen wird in der üblichen Weise, mit einer Substanzmenge, die ca. 1 mg N entspricht, ausgeführt. 2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz., 1 cm<sup>3</sup> der CuSO<sub>4</sub>—Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung und 2 oder 3 Glasperlen werden zugesetzt.

**Aufschluss:** Die Dauer der Veraschung wird vom Moment des Auftretens der weissen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Dämpfe an berechnet. 20—30 Minuten nach diesem Zeitpunkt erfolgt die Behandlung mit dem KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch und die Veraschung wird dann je nach der Aminosäure noch während 15 Minuten bis 2 Stunden fortgesetzt.

**Behandlung mit dem KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch:** Zur Beschleunigung des Veraschungsprozesses wird eine Menge von 20—30 mg (Spatelspitze) des Gemisches in sehr kleinen Portionen in die noch kochende Aufschlusslösung zugegeben. Die Praxis hat gezeigt, dass folgendes Vorgehen zu empfehlen ist: 1—2 sehr kleine Portionen zugeben, den Kolben wieder auf das Feuer stellen, nach ca. 30—40 Sekunden dieselbe Behandlung wiederholen (und das 2- bis 3mal). In der Zwischenzeit werden die übrigen Kolben behandelt.

**Destillation:** Zur Alkalisierung der verdünnten Aufschlusslösung werden 10 cm<sup>3</sup> NaOH 40-proz. verwendet. Die Vorlage, ca. 10 cm<sup>3</sup> Vorlage-Lösung in einem Erlenmeyerkolben von 100 cm<sup>3</sup>, wird vor dem Einfüllen der Aufschlusslösung unter das Silberkühlrohr gestellt, dessen Ende in die Lösung eintaucht. Die Destillation dauert 1 Minute 30 Sekunden. Diese Zeit wird mit der Stoppuhr gemessen. Nach 1 Minute 25 Sekunden wird die Vorlage auf die untere Stufe des abgebildeten Holzblockes gestellt und das Ende des Silberrohres mit 2—3 cm<sup>3</sup> Wasser gespült. Kurz darauf wird die Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe hergestellt und der Inhalt des Destillationskolbens entleert. Eine Spülung der Apparatur ist nicht notwendig. Eine neue Vorlage wird sodann bereitgestellt und die nächste Analysenlösung kann eingefüllt werden.

**Titration:** Diese kann mühelos während der Destillation der nächsten Analyse ausgeführt werden. Eine Bang'sche Bürette von 10 cm<sup>3</sup> (1/50 Teilungen) mit dem Gummiverschluss nach Bunsen wird verwendet. Das grün gefärbte Destillat wird bis zum bleibenden schwach rosa-violetten Umschlag des Tashiro-Reagens titriert.

Zur Berechnung der Stickstoffmenge wird die Anzahl der verbrauchten cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02-n. (minus Blindwert aller Reagenzien) mit dem Multiplikationsfaktor multipliziert. Zur Ermittlung des genauen Blindwertes wurden Ansätze mit allen üblichen Reagenzien, + 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O und ca. 5 mg Glucose reinst gemacht. Der Blindwert betrug 0,04 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02-n.

Die Fehlerbreite bei der Titration betrug durchschnittlich  $\pm$  0,01 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02-n., was einer Menge von  $\pm$  0,002875 mg N entspricht. An Hand von zahlreichen Bestimmungen wurde festgestellt, dass die durchschnittlichen Abweichungen der N-Werte innerhalb dieser Fehlerbreite liegen.

Die Tabelle stellt die Versuchsergebnisse für die oben erwähnten Aminosäuren dar. Lysin und Tryptophan wurden absichtlich nicht in diese Tabelle eingereiht, da diese zwei Aminosäuren sich nicht nach der allgemeinen Veraschungsmethode bestimmen lassen. Zahlreiche Versuche haben gezeigt, dass Tryptophan und Lysin, wenn sie als reine Substanzen behandelt wurden, trotz dem wiederholten Zusatz von KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch sich erst in einer Veraschungszeit von 6—7 Stunden zu 99—100% bestimmen liessen. Wird der KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch-Zusatz weggelassen und die Veraschung während derselben Dauer nur mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und dem CuSO<sub>4</sub>—Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gemisch ausgeführt, so lässt sich Lysin nur zu 85% und Tryptophan zu 85—95% bestimmen.

Als Vergleich zur *Kjeldahl*-Methode und zur Kontrolle der Reinheit der verwendeten Aminosäuren wurden diese mit der Semimikro-Dumas-Methode auf ihren N-Gehalt geprüft. Es wurde jeweils nur eine Bestimmung von jeder Substanz ausgeführt. Die Dumas-N-Werte für Lysin und Tryptophan betrugen: 15,37% N (Theorie 15,34%), resp. 13,75% N (Theorie 13,72%).

Tabelle.

Aminosäure	% N Theorie	% N nach Dumas gef.	% N nach Kjeldahl gef.	% der Theorie
$\alpha$ -Alanin . . . .	15,72	15,75	15,63; 15,71	99,48; 99,92
Norleucin . . . .	10,68	10,89	10,67; 10,68	99,96; 100,07
Glutaminsäure . .	9,52	9,61	9,51; 9,57	99,98; 100,39
Methionin . . . .	9,39	9,46	9,28; 9,35	98,86; 99,61
Histidin, HCl, $H_2O$	20,04	20,23	19,99; 20,03	99,74; 99,96
Phenylalanin . . .	8,48	8,50	8,45; 8,46	99,68; 99,76
Leucin . . . .	10,68	10,62	10,70; 10,65	100,23; 99,72
Isoleucin . . . .	10,68	10,65	10,63; 10,68	99,54; 100,00
Cystin . . . .	11,66	11,62	11,59; 11,61	99,42; 99,61
Prolin . . . .	12,17	12,28	12,16; 12,18	99,94; 100,08
Threonin . . . .	11,76	11,84	11,74; 11,68	99,81; 99,34
Valin . . . .	11,96	12,16	11,92; 11,97	99,68; 100,13
Serin . . . .	13,33	13,11	13,25; 13,24	99,42; 99,30
Asparaginsäure . .	10,52	10,59	10,50; 10,51	99,83; 99,94
Arginin, HCl . .	26,60	26,83	26,42; 26,58	99,31; 99,91
Tyrosin . . . .	7,73	7,65	7,76	100,42
Methionin . . . .	9,39	9,38	9,37; 9,38	99,84; 99,93

Alle Kjeldahl-Resultate entsprechen einem Durchschnitt von je 4 Bestimmungen.

Die beschriebene Kjeldahl-Methode wurde auch zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes von Casein und Zein angewandt. Casein lag als umgefäßtes technisches Produkt vor, Zein stammte aus den präparativen Laboratorien der *Aligena*<sup>1)</sup> und wurde dort mehrmals gereinigt. Diese zwei Eiweißstoffe wurden nach der in der Arbeit von *L. Miller, J. A. Houghton*<sup>2)</sup> angegebenen Methode analysiert.

Nach einer 4½-stündigen Hydrolyse mit  $H_2SO_4$  in langhalsigen 50 cm<sup>3</sup> Pyrex-Ampullen wurden die 2 Eiweißhydrolysate in Messkolben von 50 cm<sup>3</sup> gespült und auf die Marke gestellt. Aliquote Teile dieser Hydrolysate wurden darauf für die Veraschung verwendet.

Casein: Einwage ca. 50 mg; % N nach Dumas: 14,55%. Gef. % N nach Kjeldahl, Durchschnitt aus 4 Best.: 14,61% (bezogen auf Trockensubstanz). Die Veraschungsdauer betrug 45 Minuten bis 2 Stunden. Nach der gleichen Dauer, jedoch ohne KMnO<sub>4</sub>-Se-Behandlung wurden 99,3% des Dumas-N gefunden.

Zein: Einwage ca. 50 mg; % N nach Dumas: 16,34%. Gef. % N nach Kjeldahl, Durchschnitt aus 4 Best.: 16,19% (bezogen auf Trockensubstanz). Wir erhielten also gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten: *T. B. Osborne, S. H. Clapp*<sup>3)</sup>: 16,1%; *T. B. Osborne*<sup>4)</sup>: 16,13%; *H. B. Vickery*<sup>5)</sup>: 16,1%.

Die Veraschungsdauer war dieselbe wie für Casein. Ohne KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch konnten in derselben Zeit nur 98,47% N gefunden werden.

Dieser Analysengang für Eiweiß ist sehr zu empfehlen. Versuche, Casein und Zein in Mengen von 30—50 mg direkt zu veraschen und dann aliquote Teile der Aufschlussflüssigkeiten zu destillieren, haben bei einer Veraschungsdauer von 2—4 Stunden stets zu tiefen Resultate ergeben (95—98% des Dumas-N).

<sup>1)</sup> Wir danken Herrn Dr. R. Marbet von der *Aligena A.G.*, Basel, für die freundliche Überlassung dieser Substanz.

<sup>2)</sup> Loc. cit.

<sup>3)</sup> Am. J. Physiol. **20**, 477 (1907—98).

<sup>4)</sup> The vegetable proteins, S. 72 (1924), London 2. Aufl.

<sup>5)</sup> J. Biol. Chem. **132**, 325 (1940).

### Diskussion.

Es wurde die Anwendungsmöglichkeit der Semimikro-*Kjeldahl*-Methode für die Stickstoffbestimmung von Aminosäuren und Eiweissen mit kleinen apparativen und methodischen Änderungen geprüft. Aus den gewonnenen Resultaten geht hervor, dass die in der Tabelle angeführten Aminosäuren mit einer Veraschungsdauer von 45 Minuten bis 2 Stunden und mit Zusatz eines KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisches bis zu 99—100% ihres theoretischen N-Wertes bestimbar sind.

Die Verwendung des Oxydationsgemisches ist hauptsächlich für die Kürzung der Veraschungsdauer von Tyrosin, Prolin, Methionin, Histidin, Arginin und Phenylalanin sehr nützlich. Die übrigen in der Tabelle angeführten Aminosäuren können bereits innerhalb von 45 Minuten bis 1 Stunde verascht werden.

Lysin und Tryptophan bilden eine Ausnahme und ihr Fall gab zu zahlreichen Publikationen und Arbeiten Anlass. Eine bedeutende Anzahl von Katalysatoren wurde ausprobiert. Es sei auf die Arbeiten hingewiesen von: *Gunning*<sup>1)</sup>, *Arnold* und *Wedemeyer*<sup>2)</sup>, *S. P. L. Sørensen*, *A. C. Andersen*<sup>3)</sup>, *F. Serio*, *S. Fiandaca*<sup>4)</sup>, *A. Sreenivasan*, *V. Sadashivan*<sup>5)</sup>, *R. D. Hotchkiss*, *R. J. Dubos*<sup>6)</sup>, um nur einige der wichtigsten zu erwähnen.

Viele Autoren heben die Vorteile des Hg oder HgO als Katalysator hervor. Die Aufschlussdauer von Tryptophan und Lysin soll bedeutend kürzer sein. Wir haben aber den Aufschluss mit Se vorgezogen und die längere Veraschungsdauer dieser zwei Aminosäuren in Kauf genommen, denn wie *E. Rauterberg*, *H. Benischke*<sup>7)</sup> vermerken, hat der Aufschluss mit Se den Vorteil, dass keine Schwefelverbindung bei der Destillation verwendet werden muss, und damit die Titration nicht durch Destillieren von H<sub>2</sub>S gestört werden kann (siehe diesbezüglich die Vermerkung von *Miller* und *Houghton*<sup>8)</sup>).

Zur Veraschung von Lysin ist noch zu bemerken, dass Resultate von 99% des theoretischen Wertes bei einer Veraschungsdauer von 35 Minuten erhalten wurden, wenn das KMnO<sub>4</sub>-Se-Gemisch in dem Augenblick zugegeben wurde, als alles Wasser eingedampft war. Diese Resultate waren jedoch nicht reproduzierbar.

Was die Beständigkeit der wässrigen Ammoniaklösung in der Vorlage betrifft, so wurde festgestellt, dass ein 2 mg NH<sub>3</sub>-N entsprechendes Destillat nach 1½ Stunden noch keine merkliche Änderung erfahren hatte. Die Titrationswerte nach 2—2½ Stunden Wartezeit waren erst um ca. 1% des totalen Titrationswertes zu tief. Da aber eine Vorlage stets spätestens 2—3 Minuten nach der erfolgten Destillation titriert wird, so besteht keine Gefahr, dass in einer normalen Laboratoriumsluft Änderungen des Ammoniakgehaltes eintreten können. Die Temperatur des Destillates darf natürlich nicht stark von der Zimmertemperatur verschieden sein.

Am Schluss soll noch erwähnt werden, dass bei der Veraschung von schaumbildendem Analysenmaterial (Futtergemische, Kot u.a.m.) die Verwendung von Stearinsäure nach *H. Hadorn*<sup>9)</sup> sehr gute Resultate bei der Bekämpfung des Schäumens ergeben hat.

### Zusammenfassung.

1. Die Stickstoffbestimmung der Aminosäuren nach *Kjeldahl* wird betriebsmäßig beschrieben.

2. Veraschungsgestelle und Destillationsapparatur werden zweckmäßig modifiziert.

Wir möchten noch an dieser Stelle den Herren *P. Baumann*, *F. Hoerler* und *E. Eichenberger* für ihre Mitarbeit bestens danken.

Wissenschaftliche Laboratorien der *Aligena A.G.*, Basel.

<sup>1)</sup> Z. anal. Ch. **28**, 188 (1889).

<sup>4)</sup> Bioch. Z. **250**, 408 (1932).

<sup>2)</sup> Z. anal. Ch. **31**, 525 (1892).

<sup>5)</sup> Z. anal. Ch. **116**, 244 (1939).

<sup>3)</sup> Z. physiol. Ch. **44**, 429 (1905).

<sup>6)</sup> J. Biol. Chem. **141**, 155 (1941).

<sup>7)</sup> Bodenkunde und Pflanzenernährung [71], **26**, 97 (1941).

<sup>8)</sup> Loc. cit., S. 374. <sup>9)</sup> Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **38**, 46 (1947).