Aus dem Laboratorium der Innern Abteilung des Krankenhauses der Jüdischen Gemeinde in Berlin. (Direktor: Geh.-Rat Strauß.)

Ueber Vereinfachungen des Kjeldahl-Verfahrens, insbesondere zur Bestimmung des Reststickstoffs.

Von Dr. Arnold Hahn, Laboratoriumsleiter.

Das klassische Verfahren der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl bildet einen der Grundpfeiler der analytisch-physiologischen Chemie. Immerhin setzt es sich aber aus einer Reihe von Operationen zusammen, die seine Ausbreitung auch in jene ärztliche Kreise, denen die Hilfsmittel eines größeren Laboratoriums nicht zur Verfügung stehen, erschweren oder gar verhindern. Dies zeigt sich u. a. in besonders störender Weise bei der Ausführung von Reststickstoffbestimmungen im Blutserum. Durch die vor nunmehr fast zwei Jahrzehnten erschienenen Untersuchungen von H. Strauss, die die große Bedeutung von Reststickstoffbestimmungen für die Beurteilung der Nierenfunktion dargetan haben, ist die Untersuchung auf Reststickstoff Gemeingut der Aerzte geworden, sodaß zum mindesten für diesen Zweck eine bequeme Ausführung des Kjeldahl-Verfahrens besonders erwünscht ist. So sehen wir denn auch in den letzten Jahren das lebhafteste Bestreben, durch Ausarbeitung von Mikromethoden die Ausführung der Reststickstoffbestimmung zu beschleunigen und der Verwertung kleiner Substanzmengen anzupassen. Schon die in den „Nephritiden“ von H. Strauss angegebene Methode beschränkt sich auf die Verarbeitung von 2 cem Serum. In letzter Zeit hat besonders J. Bang ein gutes Mikroverfahren angegeben. Zur Ausführung des Bangschen Verfahrens sind jedoch noch immer viele und zum Teil kostspielige Hilfsmittel nötig, die auszuführenden Operationen sind ferner keineswegs einfach, sodaß sie für weitere Ärztekreise schwerlich geeignet sind.

Auf Anregung des Herrn Geh.-Rats Prof. Strauss befaßte ich mich daher damit, das Kjeldahl-Verfahren so zu vereinfachen, daß es ohne größere Hilfsmittel eines Chemischen Laboratoriums, speziell ohne Abzug, unter Erleichterung der auszuführenden Operationen, in kurzer Zeit ausgeführt werden kann. Hierbei ließ ich mich von folgenden Gesichtspunkten leiten:

1. Beschränkung der Hilfsmittel:
 - a) Beseitigung der bei der Verbrennung auftretenden ubelriechenden Dämpfe ohne Benützung eines Abzuges.
 - b) Ausführung der Destillation in einfachster Form, ohne Benützung von Kühlvorrichtungen.
2. Erleichterung der auszuführenden Operationen:
 - a) Einfache Bestimmung der angewendeten Substanzmenge.
 - b) Einfache und schnelle Enteiweißung.
 - c) Titration mit n/100 Alkalien und Säuren und mit einem Indikator, der sofort einen deutlichen Umschlag gibt.

Ausführung der Reststickstoffbestimmung.

Abmessen und Enteiweißen des Serums. In ein zylindrisches, nicht zu enges Zentrifugenrohr wird mittels einer genauen Pipette 1 cem Serum eingebracht. Hierzu gibt man aus einer Bürette 7 cem destillierten Wassers und hierauf mittels einer Pipette 2 cem Phosphorwolframsäure. (Die Phosphorwolframsäure wird hergestellt, indem man 5 g wolframsaures Natrium in 100 cem destillierten Wassers löst und zu dieser Lösung sodann 10 cem einer 25%igen Phosphorsäure zusetzt.) Hierauf wird einige Minuten scharf zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird durch ein kleines Filterchen in ein Reagenzrohr gegossen und dann 5 cem des klaren Filtrates, entsprechend einem halben cem Serum, verbrannt. Falls eine Zentrifuge nicht zur Verfügung steht, kann auch nach einigem Stehen bequem vom Eiweißniederschlag abfiltriert werden.

Der Dampfschlucker. Dieser einfache Glasapparat ermöglicht es kleinen Krankenhäusern und praktischen Aerzten, denen ein kostspieliger und platzraubender Abzug nicht zur Verfügung steht, die bei der Kjeldahl-Verbrennung auftretenden unerträglichen Schwefelsäureverbrennungsdämpfe ohne jede Belästigung der Atmungsorgane zu entfernen. In einem gewöhnlichen Kjeldahl-Kolben A ist ein einfach gebogenes Destillationsrohr von 30 cm Länge eingeschliffen, das in spitzem Winkel in ein vertikalstehendes T-Stück ausläuft (T). Vor dem Uebergange in das T-Stück ist ein kleines Schwimmerventil (s) angebracht, kurz nach der Biegung hinter dem Kolben ein kleiner Hahn (h) angeschmolzen. Den oberen Teil des vertikalen T-Stückes verbindet man mit einem Schlauch mit der Wasserleitung, vom unteren Teile führt ein zweiter Schlauch in das Abflußbecken. Man läßt einen hinreichend starken Strom Wasser durchfließen. Die Verbrennung gestaltet sich in folgender einfachen Weise:

In den Kjeldahl-Kolben A wird die enteiweißte Substanz (siehe oben), ein Drittel Teelöffel Kaliumsulfat, einige Körnchen Kupfersulfat und 1 cem konz. Schwefelsäure eingebracht und hierauf das Destillationsrohr aufgesetzt. Man erhitzt mit freier Flamme ohne Drahtnetz. Die zuerst entweichenden Verbrennungsgase und das Wasser werden restlos von dem fließenden Wasser verschluckt resp. desodoriert. Sobald alles Wasser der Substanz überdestilliert ist, beginnt die Schwefelsäure zu sieden, die Dämpfe gehen jedoch nicht über,

da sie schon im oberen Teile des Kolbens kondensiert werden. Dadurch entsteht ein luftverdünnter Raum, das fließende Wasser steigt in das Destillationsrohr, hebt das Schwimmerventil und wird so am Uebertreten in den Kolben gehindert. Nun wird die Verbrennung bis zur Vollendung (hellgrüne Färbung) fortgesetzt. Hierauf wird durch Öffnen des Hahnes Luft in den Apparat eingelassen, der Schliff (F) aus dem Kolben gezogen und nur lose daraufgelegt. In dieser Stellung läßt man erkalten. Die Verbrennung beansprucht etwa 5 Minuten.

Der Apparat bedarf während der Verbrennung keiner Aufsicht und ist für Kjeldahl-Bestimmungen jeder Art und natürlich auch für andere Operationen geeignet, bei denen ubelriechende, wasserlösliche Dämpfe auftreten (z. B. Eindampfen von Urin). Statt mit Schliff wird er auch mit einfachem Rohr hergestellt, das mittels Stopfens in jeden Kolben eingeführt werden kann¹⁾. Wo ein Abzug vorhanden ist, wird die Verbrennung ohne Dampfschlucker in einem gewöhnlichen Kjeldahl-Kolben von 200 cem ausgeführt, der dann auch zu der folgenden Destillation verwendet wird.

Die Destillation. Nachdem der Verbrennungskolben (A) auf etwa 60° erkaltet ist, setzt man sofort 10 cem Wasser hinzu. Die folgenden Operationen sind genau auszuführen, da nur so eine ruhige Destillation ohne Stoßen verbürgt ist: Man kühlt den Kolben unter dem fließenden Wasser der Wasserleitung ab und gibt dann mittels einer Pipette 25 cem Alkohol (etwa 94%) hinzu, indem man dabei gleichzeitig etwa an dem Halse noch haftende Schwefelsäure in den Kolben hineinspült. Nun stellt man den Kolben auf ein Drahtnetz. Als Vorlage benützt man einen zweiten Kjeldahl-Kolben (B) von etwa 200 cem Inhalt. In diesen mißt man 10 cem n/100 Schwefelsäure. Das Rohr, das in diesen Kolben cintaucht, soll nicht zu dick sein. An seinem Ende plattet man es ab, indem man mit einer Tiegelfange die Wandungen über der Flamme zusammendrückt. Es soll nur eine ganz schmale Oeffnung vorhanden sein. Sobald der Apparat zusammengestellt ist, gießt man in den Kolben A vorsichtig 5 cem 33% ige Natronlauge, und zwar so, daß dadurch die Flüssigkeit im Kolben nicht aufgerührt wird. Dies geschieht am besten so, daß man die Natronlauge an der Innenwand des Kolbens hinablaufen läßt, natürlich aber in der Weise, daß die Stellen, an die der Gummistopfen kommt, davon nicht benetzt werden. Hierauf schließt man den Kolben. Der Aufsatz (Z)

¹⁾ Der Apparat ist bei der Firma Hegershofs in Leipzig, Carolinenstr. 13, erhältlich.

auf den Kolben ist der gewöhnliche bei Kjeldahl-Destillationen benutzte Sicherheitsaufsatz. Die Flüssigkeit im Kolben darf nach Zusatz der Natronlauge nicht umgeschüttelt werden. Man erhitzt sofort mit der vollen Flamme eines starken Brenners. Die Einfachheit des Apparates ist aus der Zeichnung ersichtlich¹⁾. Eine Kühlung ist nicht nötig. Die Destillation erfolgt in vier Phasen: Zuerst siedet der Alkohol, verdichtet sich an den Wandungen der Rohre und gelangt als Flüssigkeit in die Vorlage; sobald der Apparat die Siedetemperatur des Alkohols angenommen hat, gelangt der Alkohol dampfförmig in die Vorlage; nach der Verdampfung des Alkohols beginnt sich der Wasserdampf im Apparat zu kondensieren, und man sieht nunmehr das flüssige Wasser in die Vorlage übergehen. Als letzte Phase schließlich gelangt das Wasser als Dampf in die Vorlage. Nun beginnt meistens der in dieser bereits kondensierte Alkohol zu kochen. Dies ist günstig, da dadurch die Flüssigkeitsmenge verringert wird. Ein Ammoniakverlust tritt nicht ein. Etwa 1 Minute nach Auftreten des Wasserdampfes ist die Destillation beendet. Man kocht zweckmäßig so lange, bis die Kochflüssigkeit zu stoßen beginnt. Beim Auftreten des ersten stärkeren Stoßes unterbricht man die Destillation, indem man die Gummiverbindung bei V löst. Die ganze Destillation (samt Zusammenstellen des Apparates) dauert etwa 6 Minuten. Das Rohr wird nun mit möglichst wenig Wasser außen und innen abgespritzt (das Gesamtvolumen der Flüssigkeit soll etwa 45 ccm betragen) und der Kolben unter fließendem Wasser gekühlt.

Die Titration. Man titriert mit n/100 Natronlauge. Eine genaue Titration mit n/100 Lauge resp. Säure war bisher nur mit Hilfe der Jodometrie möglich. Die Jodometrie ist ein sehr genaues Verfahren, aber sie verlangt mehr Maßflüssigkeiten als die Alkalimetrie, und diese Maßflüssigkeiten sind keineswegs haltbar und bedingen deshalb eine Unsicherheit der Resultate, die nur durch häufige Kontrollen behoben werden kann. N/100 Säuren und Alkalien sind dagegen leicht herzustellen und sehr gut haltbar. Eine genaue Titration mit so schwachen Säuren war aber bisher nicht möglich, weil es an einem geeigneten Indikator gebrach. Bei Verwendung der bisher gebräuchlichen Indikatoren war ein scharfer Farbumschlag nicht zu erreichen, da in der Nähe des Neutralisationspunktes die Farben immer wieder ineinander pendelten. Durch Zusammenstellung folgenden Indikators gelang es mir, einen scharfen Farbumschlag selbst bei n/200-Säuren zu erreichen.

Der Indikator. Herstellung: 1 g alizarinsulfosaures Natrium wird in der Hitze in 100 ccm Wasser gelöst und heiß in eine braune, gutschließende Tropfflasche filtriert. In eine zweite gleichartige Tropfflasche füllt man eine heiße Lösung von 0,05 g Methylenblau in 100 ccm Wasser. Diese Flaschen sind stets gut verschlossen aufzubewahren, da die geringste Menge Kohlensäure die Wirksamkeit des Indikators aufhebt. Auch die Titrierlange darf kein Karbonat enthalten. (Nie offen stehen lassen!)

Zu der gekühlten Absorptionsflüssigkeit setzt man nun 3 Tropfen alizarinsulfosaures Natrium und 6 Tropfen Methylenblau hinzu. Man titriert aus einer schmalen Bürette. Der Umschlag erfolgt von braungrün in violett und ist so deutlich, daß er ohne besondere Übung wahrgenommen wird. Oft ist die Tropfengröße der beiden Flaschen nicht gleich. Man wird dann durch ein, zwei Versuche leicht das richtige Verhältnis der beiden Tropfenzahlen zur Erlangung des gewünschten Umschlages feststellen können. Am sichersten ist es, wenn man mittels Pipetten 0,25 ccm alizarinsulfosaures Natrium und 0,5 ccm Methylenblau zusetzt. In Räumen, in denen mit Kohlensäure gearbeitet wurde, wird der Umschlag unscharf.

Berechnung. Die gefundene Anzahl ccm Natronlauge wird von 10 abgezogen, die Differenz mit 0,28 mg multipliziert. Man erhält so die Milligramme Stickstoff in 1 ccm Serum. Diese Zahl mit 100 multipliziert, ergibt den gebräuchlichen Wertausdruck für Reststickstoff.

$$\begin{aligned} \text{Z. B. verbraucht: } 7,8 \text{ ccm NaOH} \\ 10 - 7,8 &= 2,2 \\ 2,2 \times 0,28 &= 0,616 \\ 0,616 \times 100 &= 61,6 \\ \text{Reststickstoff ist gleich } 61,6. \end{aligned}$$

Falls die Reagenzien nicht ganz stickstofffrei sind, muß durch einen Blindversuch, zu dem man statt des Serums 1 ccm Wasser nimmt, festgestellt werden, wieviel vorgelegte Säure vom Stickstoff der Reagenzien verbraucht wird. Diese Zahl zieht man dann jedesmal von den gefundenen Werten ab.

Das angegebene Verfahren eignet sich natürlich auch zu jeder anderen Stickstoffbestimmung und ist besonders auch als Makroverfahren mit großem Vorteil zu verwenden. Bei Stickstoffbestimmungen im Urin z. B. verwendet man 1 ccm Urin, legt statt der n/100-Säure n/10-Säure vor und titriert unter Verwendung eines gewöhnlichen Indikators mit n/10 Alkali.

Bei den hier wiedergegebenen Arbeiten wurde ich von Fräulein Elisabeth Kootz in dankenswerter Weise unterstützt.

¹⁾ Der zusammengestellte Apparat wird gleichfalls von Franz Hugerhoff in Leipzig geliefert.