

## Nachtrag.

### Mikro-Kjeldahlbestimmung (S. 78 und 83).

**Reduktionsmethode nach A. Elek u. H. Sobotka.** Die Versuche über die Anwendung von Glukose als Reduktionsmittel für Nitro-, Nitroso- und Azoverbindungen haben die Angaben der Autoren bestätigt. Glukose als Reduktionsmittel ist wesentlich günstiger als die Verwendung von Metallen, da die Veraschung und die Reduktion in einem Prozeß vor sich geht und die Gefahr, daß die beim Zusatz von Alkali ausfallenden Metallhydroxyde Ammoniak zurückhalten, nicht besteht. Man gibt zur eingewogenen Substanz 100 mg Glukose, 1 g Kaliumsulfat, ein kleines Kriställchen Kupfersulfat und 3 ccm konz. Schwefelsäure. Vorteilhafter ist es, an Stelle von Kupfersulfat ein kleines Tröpfchen Quecksilber oder eine kleine Messerspitze Quecksilberacetat zuzufügen, da die Veraschung rascher vor sich geht. Es ist streng darauf zu achten, daß auch die geringsten Mengen Wasser ferngehalten werden und die konz. Schwefelsäure unverändert zur Einwirkung gelangt. Die Gegenwart geringer Mengen Feuchtigkeit verursacht beim Erhitzen ein derart starkes Schäumen der Lösung, daß eine verlustlose Veraschung kaum durchführbar ist.

Man erhitzt das Kölbchen zunächst vorsichtig mit kleiner Flamme und dreht es gelegentlich um seine Achse bis sich ein homogener schwarzer Brei gebildet hat. Dann dreht man die Flamme so weit auf, daß sie das Kölbchen berührt und überläßt nun die Veraschung sich selbst. Innerhalb einer Stunde ist die Schwefelsäure klar, nach einer weiteren Stunde ist die Veraschung beendet. Sobald die Schwefelsäure sich zu klären beginnt, dreht man das Kölbchen gelegentlich, um die in dem Kölbchenhals befindliche Kohle durch die zurückfließende Schwefelsäure in das Kölbchen zu spülen.

In Anbetracht der größeren Menge Schwefelsäure, die bei dieser Bestimmung erforderlich ist, muß bei der Überleerung der Schwefelsäure in den Destillationsapparat geachtet werden, daß sich nicht zu viel Flüssigkeit im Destillierkolben ansammelt, da es

sonst während der Destillation leicht zu einem Überspritzen der Lauge kommt. Nach dem Erkalten des Kölbchens spült man den Hals desselben mit Wasser ab bis das Kölbchen zu zwei Dritteln seines Volumens mit Wasser gefüllt ist, schüttelt kräftig um und überleert in den Destillationsapparat. Man wartet ab, bis sich die letzten Flüssigkeitsreste am Rand des Halses gesammelt haben und spritzt diesen kurz ab. Beim zweiten Ausspülen nimmt man nur 1 bis 2 ccm Wasser. Ein drittes und viertes Mal wäscht man das Kölbchen mit der 30%igen Lauge nach (s. S. 76), wobei man jedesmal das Kölbchen nicht ganz bis zur Hälfte füllt und beim Ausgießen ständig dreht. Destillationszeit 7 Minuten, vom heftigen Wallen der Flüssigkeit an gerechnet. Nach dem Senken des Vorlagekölbchens noch eine Minute destillieren.

**Vorteile des Verfahrens für Mikro-Kjeldahlbestimmungen im allgemeinen.** Aus dem Reduktionsverfahren von Elek und Sobotka ergeben sich einige Vorteile für die Kjeldahlbestimmung, auch wenn ein Reduktionsprozeß nicht erforderlich ist.

1. Die Veraschung mit einer größeren Menge Kaliumsulfat (bis zu 0,5 g pro ccm Schwefelsäure) und einer geringen Menge Kupfersulfat bzw. Quecksilbersalz ist für den rascheren Verlauf derselben wesentlich günstiger als das bisher verwendete Gemisch von Kupfer- und Kaliumsulfat.

2. Bei schwer zersetzlichen Stoffen oder solchen, bei welchen der Verkohlungsprozeß kaum in Erscheinung tritt, ist der Zusatz von einer Messerspitze Glukose sehr empfehlenswert. Wir erhielten bei schwer zersetzlichen Eiweißpräparaten nach Zusatz von Glukose vollkommen konstante Stickstoffwerte, die um mehr als 1% höher waren als bei Veraschung ohne Glukose. Auf jeden Fall ist die Anwendung von Glukose günstiger als die Verwendung von Perhydrol, welches zwar die Veraschung beschleunigt, doch immer die Gefahr eines Stickstoffverlustes in sich schließt.

**Veraschungsmethode zur generellen Anwendung der Mikro-Kjeldahlbestimmung.** Das Reduktionsverfahren mit Glukose ist, wie alle bisherigen Reduktionsverfahren, nur für Nitro-, Nitroso- und Azoverbindungen anwendbar. Die in erster Linie für die physiologische Chemie wichtigen Hydrazinverbindungen können nach diesem Verfahren nicht analysiert werden. Untersuchungen über die Ursache dieses Verhaltens der Hydrazinverbindungen, über welche demnächst berichtet wird, führten zur Ausarbeitung eines neuen Verfahrens, nach welchem jede Art stickstoffhaltiger Substanz (mit Ausnahme der Nitrate, welche sich infolge Flüchtigkeit der freien Salpetersäure der Einwirkung entziehen) richtig analysierbar ist. Dadurch wird die Anwendung der Mikro-Dumas Verbrennungsmethode entbehrlich und die dieser Methode

anhaftenden Mängel (Versagen durch unvollkommene Verbrennung der Substanz, s. S. 74) können in zweifelhaften Fällen durch die Kjeldahlbestimmung nachgewiesen werden. Im nachstehenden wird die Arbeitsvorschrift wiedergegeben:

Zu der in das vollkommen getrocknete Zersetzungskölbchen eingewogenen Substanz (s. S. 76) fügt man einige Körnchen roten Phosphors, dann ein Kubikzentimeter Jodwasserstoffsäure (d. 1,7) und erhitzt auf dem Veraschungsgestell mit kleinem Flämmchen, bis die Jodwasserstoffsäure siedet. Man läßt eine halbe Stunde ruhig kochen (nicht zu lebhaft), nimmt dann das Kölbchen und spritzt den Hals innen gründlich mit Wasser ab bis der Kolben zur Hälfte mit Wasser gefüllt ist. Nach gutem Durchmischen fügt man 2 ccm konz. Schwefelsäure zu, schüttelt um und legt das Kölbchen wieder auf das Veraschungsgestell.

Man heizt nun kräftig an, so daß die Flamme das Kölbchen berührt und die Flüssigkeit in lebhaftes Sieden gerät. Zunächst destilliert Wasser ab, dann Jodwasserstoffsäure und schließlich Jod und Jodwasserstoffsäure. Innerhalb einer Stunde ist die Jodwasserstoffsäure vertrieben und das Kölbchen wieder blank. Man setzt das Erhitzen fort, bis keine Joddämpfe mehr sichtbar sind, ergreift dann das Kölbchen mit einer Holzklammer, läßt eine kleine Messerspitze Quecksilberacetat und eine große Messerspitze Kaliumsulfat in das Kölbchen fallen und stellt es auf das Verbrennungsgestell zurück. In der Regel ist nach dem Verschwinden der Joddämpfe die Schwefelsäure bereits klar. Man läßt ungeachtet dessen nach dem Zufügen der Salze noch eine halbe Stunde kochen.

Die Entfernung der Jodreste aus dem Hals des Kölbchens gelingt durch gelegentliches Drehen desselben; wesentlich ist, daß die Schwefelsäure kocht. Ein sich zwangsläufig einstellendes mäßiges Stoßen derselben stört nicht. Die im Hals des Kölbchens anhaftenden Salzreste sind nicht zu beachten.

Während des Abdestillierens der Jodwasserstoffsäure schaltet man zwischen Saugpumpe und Absaugvorrichtung eine Waschflasche mit 30%iger Lauge, um Jod und Jodwasserstoff zurückzugewinnen. Die mit Jod bzw. Jodwasserstoff benetzte Absaugvorrichtung reinigt sich von selbst während des Kochens der Schwefelsäure.

Nach dem Abkühlen wird der Kolbeninhalt in den Destillationsapparat überleert, wie vorangehend bei der Reduktionsmethode von Elek und Sobotka beschrieben. Nach der Reduktionsmethode mit Jodwasserstoffsäure haben wir serienweise Bestimmungen von Nitro-, Nitroso- und Azoverbindungen, ferner Hydrazinsulfat, Dinitrohydrazone, Osazone, Oxime usw. aus-

geführt. Auch für schwer zersetzliche Eiweißkörper hat sich die vorangehende Hydrolyse bzw. Reduktion sehr vorteilhaft erwiesen. Fehlergrenze der Methode:  $\pm 0,25\%$ .

**Blindwerte bei der Kjeldahlbestimmung.** Gelegentlich der Untersuchungen über die Reduktionsmethode mit Glukose und der Ausarbeitung des Reduktionsverfahrens mit Jodwasserstoffsäure, bei welchen immer Serien reiner Testsubstanzen zur Analyse gelangten, wurden die Blindwerte der Apparatur und der Reagenzien ständig genauestens geprüft. Obwohl immer die gleiche Apparatur und dieselben Reagenzien zur Verwendung gelangten, wurden gelegentlich Blindwerte beobachtet. Es hat sich gezeigt, daß das Ausdämpfen der Apparatur vor den Bestimmungen nicht immer seinen Zweck erfüllt. Ein verlässlicheres Verfahren ist folgendes: Während der Wasserdampfentwickler angeheizt wird, öffnet man die beiden Quetschhähne am Rezipienten, verbindet den unteren Abfluß mit der Wasserstrahlpumpe und saugt an. Dann hält man ein Becherglas mit destilliertem Wasser unter den Kühler und läßt den ganzen Inhalt durch die Apparatur laufen. Das Durchspülen mit Wasser wiederholt man noch einmal und schaltet dann die Saugpumpe ab. Anschließend wird die Apparatur ausgedämpft, nach dem Zurücksaugen des Kondenswassers sogleich mit der Füllung und Destillation begonnen. Es empfiehlt sich, vor jeder Serie von Destillationen diese Reinigung vorzunehmen, zumal sie keinen Zeitverlust bedeutet.

Weiters wurde beobachtet, daß die erste Bestimmung in einer Serie immer zu hohe Stickstoffwerte ergab. Die Ursache vermuten wir im Titrierkölbchen, welches vor jeder Serie von Bestimmungen mit heißer Schwefelchromsäure gereinigt und dann ausgewaschen und ausgedämpft wurde. Es ist möglich, daß durch die Behandlung mit heißer Schwefelchromsäure die Glasoberfläche stärker angegriffen wird und nachträglich noch etwas Alkali abgibt. Wir beobachteten öfter bei frisch gereinigten Kölbchen einen geringeren Verbrauch an Lauge gegenüber der vorgelegten Säure. Es ist ratsam, das Kölbchen nach Schwefelchromsäurebehandlung zweimal auszudämpfen und anschließend den Titer der Säure gegen die Lauge zu prüfen. Ist dieser in Ordnung, kann das Kölbchen in Verwendung kommen. Für die folgenden Titrationsen wird immer das gleiche Kölbchen ohne besondere Zwischenreinigung verwendet.

Beim Aufkochen der Säure sind Siedeverzüge häufig; öfteres Umschwenken des Kölbchens ist notwendig. Nach 10 Sekunden langem Kochen ist die Kohlensäure sicher verdrängt, man spritzt die Wandung kurz ab und beginnt sogleich mit der Titration.