

Zur Formoltitration der Aminosäuren im Harn.

Von

Dr. H. Malfatti.

(Der Redaktion zugegangen am 17. April 1910.)

Im Verlaufe der letzten Zeit sind eine ganze Reihe von Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Mengenbestimmung der Aminosäuren im normalen Harn mit Hilfe der Formoltitrierung beschäftigen. In mehreren dieser Arbeiten wurde nun ein ganz unglaublich hoher Prozentgehalt des normalen Harnes an Aminosäuren festgestellt. So fand z. B. V. Henriques¹⁾ im Mittel aus vier Versuchen 0,2% (als Glykokoll berechnet). Walter Frey und Alfred Gigon²⁾ 0,12%. V. Henriques und S. P. L. Soerensen in ihrer II. und III. Abhandlung³⁾ immerhin noch einen Gehalt von 0,09 und 0,08%. Dieselbe Mittelzahl findet auch Tanzo-Yoshida⁴⁾.

Solche Resultate müssen Verwunderung und auch Vorsicht erregen. Die zahlreichen Publikationen, in welchen die Menge der Aminosäuren mit Hilfe der Naphthalinsulfochloridmethode ermittelt werden sollte, führen im allgemeinen zur Ansicht, daß in normalen Harnen zwar manchmal etwas erheblichere Mengen dieser Substanzen vorkommen können, daß aber ihre Menge in den meisten Harnen unter der Grenze der Nachweisbarkeit bleibt. Wenn z. B. G. Oehler⁵⁾ bei einem Zusatz von 0,3 g Glykokoll zu 1330 ccm eines Harnes, der mit Naphthalinsulfochlorid nicht reagiert hatte, 0,277 g des β -Naphthalinsulfoglykokolls erhalten konnte, ist es doch ganz unver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 1.

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

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 27, u. Bd. LXIV, S. 120.

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 239.

⁵⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XXI, S. 484.

ständig, warum sich Gehalte von 0,08—0,2% Glykokoll nicht offenbaren sollten. Auch die günstigen Resultate, welche eine Reihe von Autoren bei der Formoltitration des Ammoniaks im Harn erzielten, und ebenso die vielen Arbeiten, welche sich mit der Auflösung des Stickstoffrestes im Harn beschäftigen, lassen die Anwesenheit so großer Mengen von Aminosäuren recht unwahrscheinlich erscheinen.

Ich selbst habe nun schon in meiner ersten Arbeit (Zeitschrift f. analyt. Chemie Bd. XLVII S. 273) auf die geringe Menge der im normalen Harn vorkommenden Aminosäuren hingewiesen und diese Angabe später (Diese Zeitschrift Bd. LXI S. 499) dahin erweitert, daß im normalen Harn vielleicht kein Glykokoll vorkommt, jedenfalls aber nicht mehr, als einer Menge von wenigen Milligrammen formoltitierbaren Stickstoffs entspricht.¹⁾ Gleichzeitig habe ich aber auch Henriques gegenüber den Grund angegeben, der nach meiner Ansicht die eingangs erwähnten überraschend hohen Glykokollwerte erklärt.

Henriques²⁾ hatte nämlich den von Phosphaten befreiten Harn gegen Lackmus neutralisiert und dann einerseits das Ammoniak, andererseits den gesamten formoltitierbaren Stickstoff unter Zuhilfenahme von Phenolphthalein als Indikator bestimmt. So müssen natürlich alle schwachsauren Substanzen des Harns, welche nicht auf Lackmus, wohl aber auf Phenolphthalein reagieren, mittitriert und fälschlich dem formoltitierbaren Stickstoff zugezählt werden.

Soerensen³⁾ nun, der Schöpfer der Formoltitration, hat

¹⁾ Die dort beschriebene Methode der Glykokollbestimmung nach Entfernung des Ammoniaks durch Quecksilber muß ich fallen lassen. Ihre negativen Resultate in bezug auf das Vorkommen von Glykokoll bleiben zwar mit den angegebenen Beschränkungen aufrecht. Als allgemeine Methode, etwa für klinische Zwecke, ist sie aber zu unsicher. Bei einer Versuchsreihe an mir selbst zeigten sich nämlich (besonders nach reichlichen Mahlzeiten, gleichgültig ob aus Fleisch oder Vegetabilien bestehend) auffallend hohe Werte der Formoltitration. Ich konnte nachweisen, daß es sich um Ammoniak handelte, welches unter besonderen, nicht weiter ermittelten Umständen der Ausfällung entgeht.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 1.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 27.

diesen meinen Standpunkt nicht anerkannt. Er nimmt an, daß die Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthaleinneutralität im phosphat- und carbonatfreien Harn nur durch die Anwesenheit von Ammoniak und Aminosäuren bedingt sei, und daß daneben die andern schwach dissoziierten Säuren des Harns ihrer geringen Menge wegen nicht in Betracht kämen. Dieser Ansicht von Soerensen sind auch die Autoren der früher genannten Arbeiten; auch sie titrieren von der Lackmusneutralität ausgehend bis zur Rötung von Phenolphthalein und kommen so zu den hohen Aminosäurewerten.

Nicht aus Rechthaberei, sondern weil der Frage wirklich eine bedeutende Wichtigkeit zukommt, wie schon die vielen und rasch sich folgenden Publikationen über dieselbe beweisen, bitte ich, den Ausführungen Soerensens und der Ansicht der andern Autoren gegenüber, meinen ersten Standpunkt nochmals klarlegen und verteidigen zu dürfen.

Wenn es sich darum handelt, reines Ammoniak oder Aminosäuren neben anderen starken Säuren durch Formoltitration zu bestimmen, etwa in den Produkten der Eiweißhydrolyse oder im Anschluß an die Säureoxydation im Kjeldahlprozeß, dann ist es vollberechtigt, die Formoltitration bei der Lackmusneutralität beginnen zu lassen, wie es etwa P. Rona und R. Ottenberg¹⁾ tun. John Wilkie²⁾ verwendet Methylrot. Ronchese³⁾ aber, der Begründer der Methode, erklärt jeden für Ammonsalze unempfindlichen Indikator für brauchbar.

Wie die Sache bei der Bestimmung im Harn steht, möge das später folgende Beispiel zeigen, das ich aus einer Reihe ganz gleich verlaufender Versuche herauswähle, nicht weil es besonders auffallende Resultate zeigt, sondern weil es am vollständigsten und ohne Nebenversuche durchgeführt ist und besonders weil alle Doppelbestimmungen besser stimmen als in den andern Versuchen, so daß die Unsicherheit der Mittelzahlen größtenteils fortfällt.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 355.

²⁾ Journ. Soc. Chem. Ind., Bd. XXIX, S. 6, nach Chem. Zentralblatt, 1910, I., S. 1053.

³⁾ Journ. Pharm. et Chim., Bd. XXV, S. 611.

Einige Bemerkungen müssen aber vorausgeschickt werden. In bezug auf die Formoltitration bin ich auch hier bei der ursprünglich von mir beschriebenen Methode geblieben. Vor allem verwendete ich nicht $\frac{n}{s}$ Lauge wie Soerensen, sondern die mehr als doppelt so schwache Lauge, von der jeder Kubikzentimeter ein Milligramm Stickstoff anzeigt. Da hier der Laugeverbrauch nie bedeutend ist, kommt auch die beim Titrieren entstehende Verdünnung nicht in Betracht, Fehler und Differenzen aber treten viel auffälliger hervor. Auch das Formalin setzte ich nicht von vornherein und im Überschuß zu, sondern portionenweise, dem Bedarf entsprechend, während des Titrierens; natürlich müssen dann beim Titrieren auf stärkere Rötung nach Soerensen stets besondere Kontrollösungen hergestellt werden.

Die größten Schwierigkeiten bereitete die Bestimmung der Lackmusneutralität. Ich benutzte ein Lackmuspapier, wie es vor vielen Jahren zum Zwecke der Bluttitration eingeführt wurde, und das man darstellt, indem durch Alkohol und Dialyse gereinigte Lackmuslösung auf säure- und alkalifreies Druckpapier aufgemalt wird. Natürlich kann man auch Azolithmin nehmen; das Azolithminpapier, wie es Soerensen neuerlich beschreibt, war für die vorliegenden Versuche weniger geeignet, weil bei den vielen Tüpfelproben zuviel Flüssigkeit verloren ging, während von glattem Papier die einzelnen Tropfen mit dem Glasstab leicht wieder abgenommen werden konnten. Als Farbe für das hier verwendete Papier wählte ich nicht das sonst bessere Lila, sondern einen etwas rötlicheren Farbenton und bezeichnete als Lackmusneutralität jenen Punkt, bei dem ein Tropfen der Flüssigkeit auf dem Papiere eben eine Andeutung von Umschlag in Blau erkennen ließ. Das ist also schon Lackmusalkalität und die Differenzen, auf die ich hier aufmerksam machen will, erscheinen kleiner, als sie vielleicht in Wirklichkeit sind, und als sie bei Verwendung bläulichen Papiers gefunden worden wären.

Verwendet man nämlich bei der Titration von Harn oder daraus hergestellten Lösungen rotes und blaues Lackmuspapier, so zeigt sich auch bei Abwesenheit von Phosphaten, daß zur bestimmten Zeit das blaue Papier noch rot gefärbt wird, wäh-

rend das rote schon längst sich bläulich färbt (Zone der amphoteren Reaktion). Es wird eben der rote und der blaue Lackmusfarbstoff durch die schwachen Säuren und phenolartigen Körper des Harns in die verschiedenen Nuancen des violetten Lackmus übergeführt und so ein Farbenumschlag hervorgerufen, der durch seine Kontrastwirkung saure und alkalische Reaktion in derselben Flüssigkeit vortäuscht. Nimmt man aber neutrales Lackmuspapier, sei es glattes oder Filtrierpapier, so sieht man, daß beim Titrieren ein Punkt eintritt, bei dem das Papier keine Anzeichen stärkerer Rötung mehr zeigt, die Flüssigkeit also neutral zu sein scheint; aber erst nach längerem Zutropfen der Lauge tritt eben merklicher Umschlag nach Blau hin auf. Mit einem Worte die Lackmusneutralität ist kein bestimmter Punkt, sondern eine Zone, deren Breite mit der Empfindlichkeit des Auges — daneben aber auch mit anderen Faktoren — stark schwankt. Ich habe im Verlaufe der vorliegenden Versuche sehr häufig versucht, die Breite dieser Zone zwischen verschwindender Lackmusrötung (La) und auftretender Bläuung (Lb) zu bestimmen. Der höchste im phosphatfreien Harn beobachtete Wert war 1,6 ccm der Lauge ($n/14$) für je 10 ccm Harn, gewöhnlich schwankte er um 0,5 ccm herum.

Der Harn nun, über den ich zu berichten habe, war ein Mischharn von zwei gesunden Personen, der eine hoch konzentriert dunkel und stark sauer, der andere licht, verdünnt und fast alkalisch. Das Gemenge selbst wies ein spezifisches Gewicht von 1,0205 auf, war klar goldgelb. 100 ccm zeigten (nach meiner Methode formalitriert) eine Acidität von 0,0965 g Salzsäure und einen Gehalt von Ammoniakstickstoff von 0,041 g, während der nach Schloesing bestimmte Wert 0,0376 g betrug. Nebenbei sei bemerkt, daß die oben erwähnte Differenz von La zu Lb in 10 ccm dieses Harns 0,8 und 0,9 ccm der Lauge, nach Entfernung der Phosphorsäure 0,5 und 0,6, und nach weiterer Entfernung des Ammoniaks ebensoviel betrug.

10 ccm dieses Harnes brauchten, um von der Lackmusneutralität (Lb) zum Phenolphthaleinumschlag gebracht zu werden. 2,9 ccm der Lauge. Nun wurde Formol zugesetzt und titriert bis zum Farbenumschlag des Phenolphthaleins, wozu 4,1 ccm

der Lauge verbraucht wurden; um zur starken Rötung zu gelangen, mußten noch 0,7 ccm der Lauge zugesetzt werden. Wenn nun, um diese Resultate in Prozenten Ammoniakstickstoff umzurechnen, die Lackmusneutralität zugrunde gelegt wird, so erhält man bei Titration bis zum schwachen Umschlag 0,07% (0,068—0,071), bei Titration zur starken Rötung 0,077% (0,076 bis 0,078). Die entsprechenden Zahlen gerechnet von der Neutralität gegen Phenolphthalein sind 0,041 und 0,048% (bei vollständiger Übereinstimmung der Parallelbestimmungen). Der für den Harn nach Schloesing ermittelte Wert ist aber 0,0376%.

Für den ursprünglichen Harn mit seinem Phosphorsäuregehalte sind solche Resultate auch nicht verwunderlich, und niemand hat wohl daran gezweifelt, daß für ihn die Phenolphthaleinneutralität als Ausgangspunkt der Formoltitration benutzt werden muß. Wenn dabei, infolge des besonderen Verhaltens der Ammonsalze, kleine Fehler unvermeidlich sind, so ist zu bedenken, daß die Methode, wenigstens von mir, ausdrücklich nur als «klinische» (nicht als «klassische», wie H. Bjoern-Andersen und Marius Lauritzen in dieser Zeitschrift, Bd. LXIV S. 27, einem bekannten Referate nachschreiben) veröffentlicht und empfohlen worden ist.

Wie stellen sich nun die Resultate, wenn der Harn mit Chlorbaryum und Ätzbaryt (hier in Pulverform angewendet) von den Phosphaten befreit wurde. Da betrug erstens der Ammoniakgehalt nach Schloesing bestimmt nur mehr 0,035% Stickstoff. In anderen Fällen war dieser Verlust noch viel größer und er erklärt sich leicht durch die Annahme, daß beim Filtrieren der alkalischen Flüssigkeit Ammoniak abdunstet; auch kann wohl ein Teil des Ammoniaks als Ammonium-Magnesiumphosphat im Niederschlag zurückgehalten werden. An Stelle dieser 0,035% Ammoniakstickstoff wurden nun gefunden; vom Lackmus ausgehend 0,045, oder 0,049 bei Titration bis zu starker Rötung; vom Phenolphthalein ausgehend 0,0385 bzw. 0,043%.

Die wichtigste Frage ist aber die, wie sich der Harn nach Entfernung auch des Ammoniaks verhält. Es wurde also die eben beschriebene Flüssigkeit mit recht wenig überschüssigem Barytwasser im Vakuum bei 35—40° unter Durchleiten von

Luftbläschen destilliert, der Rückstand wieder verdünnt und wieder destilliert, bis ein dreistündiges Destillieren nur mehr 0,8 mg Stickstoff in die vorgelegte Säure übertreten ließ. Der Destillationsrückstand wurde nun filtriert und mit Waschwasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, wobei zum Filtrat die nötige Schwefelsäure und Kaliumsulfat zugefügt wurde, so daß eben die Lackmusneutralität (Lb) erreicht war. Die erhaltene Flüssigkeit wurde dann unter vorzüglicher Übereinstimmung der Parallelbestimmungen formoltriiert, teils allein, teils nach Zusatz von Glykokoll, teils nach etwas mehr als 14tägigem Stehen in der Kälte. Da der Versuch im Winter ausgeführt wurde, war die letztere Probe in geschlossenem Gefäße vor das Fenster gestellt worden, wo sie meistens in gefrorenem Zustand stehen blieb. Durch mehrere Tage mit milderer Temperatur war die Flüssigkeit allerdings aufgetaut; eine Bakterienentwicklung ist aber doch mit der größten Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Die folgende Tabelle möge die Resultate zeigen. Die Zahlen sind Kubikzentimeter der n_{14} Lauge.

| 10 ccm des Harns | Differenz von Lackmus zu Phenol- phthalein- Neutrali- tät | Resultate der Formoltriiierung in mg Stickstoff ausgehend von Neutralität gegen | | | | Differenz von schwacher und starker Rötung des Phenol- phthaleins am Schluß der Titration |
|--|--|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|
| | | Lackmus | | Phenolphthalein | | |
| | | bis zu schwacher Rötung | bis zu starker Rötung | bis zu schwacher Rötung | bis zu starker Rötung | |
| Nur von Phosphorsäure befreit (Henriques) | 0,57 | 4,45 | 4,92 | 3,82 | 4,3 | 0,47 |
| Von Phosphor- säure und Ammoniak befreit | 0,55 | 1,2 | 1,7 | 0,7 | 1,2 | 0,5 |
| Nach Zusatz von 20 mg Glykokoll = 3,74 mg N | 0,55 | 5,0 | 5,45 | 4,45 | 4,9 | 0,45 |
| Nach Zusatz von 10 mg Glykokoll = 1,87 mg N | 0,5 | 3,1 | 3,6 | 2,6 | 3,1 | 0,5 |
| Ohne Zusatz nach langem Stehen in der Kälte | 1,1 | 2,2 | 2,5 | 1,1 | 1,4 | 0,3 |

Aus dieser Tabelle geht folgendes hervor. 1. Weder die Differenz zwischen Lackmusneutralität und Phenolphthaleinneutralität im Anfange der Formoltitration, noch auch die Differenz zwischen den Punkten der schwachen und starken Rötung des Phenolphthaleins am Schluß der Titration, wird durch die Entfernung des vorhandenen Ammoniaks (0,0425%) merklich beeinflusst; auch Zusatz von Glykokoll in Mengen von 0,2% übt keinen Einfluß darauf. Es müssen daher diese Differenzen nicht auf die genannten Substanzen, sondern auf andere Harnbestandteile zurückgeführt werden.

2. Dem entsprechend vorbereiteten Harn in nicht zu großen Mengen zugesetztes Glykokoll wird durch die Formoltitration bei jeder Art ihrer Durchführung quantitativ wiedergefunden, da es sich ja um Differenzbestimmungen handelt. Jene Methode, welche die schärfsten Umschlagspunkte bietet, ist daher als die sicherste zu empfehlen.

3. Die von mir seinerzeit beobachtete Neubildung von formoltitrierbarer Substanz bei längerem Aufbewahren des Harns hat sich auch hier wieder gezeigt. Auffallend ist dabei, daß die Differenz zwischen Lackmus- und Phenolphthaleinneutralität sehr beträchtlich anwuchs, während die Differenz am Schlusse der Titration zwischen Phenolphthaleinumschlag und starker Rötung kleiner wurde.

Tanzo Yoshida konnte in seiner Arbeit (l. c.) diese meine Beobachtung nicht bestätigen. Immerhin findet er in seinen zwei Versuchen im Harn nach mehrtägigem Stehen unter Toluol eine solche Vermehrung des formoltitrierbaren Stickstoffes im Betrage von 5,4 und 4,5 mg, entsprechend 28,9 und 24,1 mg Glykokoll. Diese Zahlen dürften sich wohl, was aus den Angaben nicht ersichtlich ist, auf 1000 ccm Harn, oder gar auf die Tagesmenge beziehen und da die Bestimmung in 16 ccm Harn vorgenommen wurde, fällt die kleine Versuchsdifferenz allerdings in die Fehlergrenze der Methode (besonders bei Verwendung der unsicheren Lackmusneutralisation), aber es ist doch auffallend, daß dieser Fehler beide Male in der gleichen Richtung in Erscheinung trat. Ich habe übrigens die deutliche Vermehrung nicht in zwei, sondern in mehr als

zwanzig Fällen nachweisen können. Ich vermute, daß der Erscheinung überhaupt wenig Wichtigkeit zukommt, und daß es sich um eine geringe hydrolytische Ammoniakabspaltung handelt, wie sie ja auch bei länger fortgesetzter Vakuumdestillation oder beim Folinschen Verfahren, wenn auch in geringerem Maße, in Erscheinung tritt. Die Körper der Oxyprotsäuregruppe, als Baryumsalze aus eingedampftem Harn nach Dombrowski abgeschieden, scheinen dabei nach einem Versuche nicht beteiligt zu sein. (Carbamin- oder Uramidosäuren?)

Wenn man aus den Zahlen der obigen Tabelle versucht, den Gehalt des untersuchten Harns an Aminosäuren zu berechnen, so erscheint ihre Menge von 0,037 bis zu 0,088% (als Glykokoll) schwankend, je nach der angewandten Arbeitsweise. Ähnliche Resultate, sowohl was die absoluten Zahlen als auch ihr Verhältnis untereinander anlangt, gaben mir alle andern Versuche an normalen Harnen, obwohl ich das Ammoniak in der verschiedensten Weise entfernte. (Die Quecksilbermethode, die viel niedrigere Werte liefert, habe ich nicht mehr in Betracht gezogen.)¹⁾ In allen Fällen zeigte es sich auch, daß größere Differenzen nicht von der Art der Formoltitrierung, d. h. dem ziemlich konstanten Unterschied der Titrierung bis zu schwacher oder starker Rötung herrühren, sondern von der Wahl des Ausgangspunktes, je nachdem er durch die Reaktion auf Lackmus oder auf Phenolphthalein bestimmt wird. In einem Falle — es handelte sich um einen eingesandten, wahrscheinlich pathologischen Harn, in dem die formoltitrierbare Stickstoffmenge 0,019 oder 0,039% betrug, entsprechend 0,1 oder 0,2% Glykokoll — betrug diese Differenz 1,5 ccm der

¹⁾ Recht praktisch erwies sich die von Wiechowski angegebene Methode (Arch. f. exper. Pathol., Bd. LX, S. 193), die ich so anwandte: 30 ccm Harn wurden in einem mit Marke versehenen Stöpselglas mit etwas Natriumphosphat, Magnesiumsulfat und dann Magnesiumoxyd versetzt und mit Alkohol auf 120 ccm aufgefüllt. Nach dem Stehen über Nacht wurden 100 ccm abfiltriert (entsprechend 25 ccm Harn), durch Destillieren im Vakuum vom Alkohol befreit und der Formoltitration unterworfen. Durch vorsichtiges Abdunsten des Alkohols (der die Titration absolut hindert) auf dem schwach geheizten Wasserbad ließe sich wohl auch die Vakuumdestillation vermeiden.

Lauge. Bei dem Versuche die störenden Substanzen auszufällen, ergab sich, daß Tierkohle die Differenz verminderte; Auskochen mit Bleicarbonat erhöhte auf 5,6 ccm; Ausfällen mit Bleiacetatpulver erhöhte auch auf 3,0 ccm trotz sorgfältiger Entfernung der Kohlensäure durch Ätzbaryt; und beliebig hohe Steigerungen ließen sich durch einfachen Zusatz von Natriumacetatkrystallen hervorrufen. Weitere Versuche ergaben nun, daß alle fetten Säuren von der Ameisensäure in steigendem Maß bis zur Capronsäure bei der Neutralisation eine starke Differenz zwischen den Umschlagspunkten von Lackmus und Phenolphthalein erkennen lassen, ebenso wirkt Zitronensäure. Bei Anwendung von Milch-, Oxal-, Wein-, Bernsteinsäure und ebenso von Benzoe-, Salicyl- und Hippursäure trat aber der Farbumschlag beider Farbstoffe fast gleichzeitig ein. Ein aus Harn dargestelltes Oxyprotsäurengemenge wirkte zwar ein, aber nicht so stark, als ich vermutet hatte; hingegen verschob Carbolsäure die beiden Neutralitätspunkte sehr stark, und diese vergrößerte auch die Differenz zwischen der schwachen und der starken Rötung des Phenolphthaleins am Ende der Formoltitration.

Welche von den vielen Harnbestandteilen nun die besprochene Differenz bei der Titrierung des von Phosphaten und Carbonaten freien Harnes bewirken, läßt sich nicht sagen, aber sie sind vorhanden und müssen deshalb berücksichtigt werden, indem man als Neutralitätspunkt nicht den Umschlag von Lackmus, sondern jenen von Phenolphthalein benützt.

Nun ist es aber eine altbekannte Tatsache, daß Ammoniak in Gegenwart von Ammonsalzen, und auch Aminosäuren den Phenolphthaleinumschlag verzögern. Es wäre zu erwägen, ob nicht im Harn diese Verzögerung größer ist, als die entgegengesetzte Beeinflussung seitens der schwachen Säuren und phenolartigen Körper. Wenn das wäre, müßte natürlich der kleinere Fehler vorgezogen und unter Verwendung von Lackmus titriert werden.

Die Resultate der früher vorgelegten Tabelle, oder ein Blick auf die sorgfältigen Zahlenangaben von Soerensen (Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 27) läßt nun schon erkennen, daß

diese Befürchtung unnötig ist, besonders dann, wenn es sich nach Entfernung des Ammoniaks nur mehr um die Titration der Aminosäuren handelt. Es sind aber in der einschlägigen Literatur der letzten Zeit so merkwürdige Äußerungen getan worden über die Acidität der Ammoniumsalze und ihre Einbeziehung in die Totalacidität des Harnes, über die schwache Säure der Aminosäuren und die starke ihrer Methylenderivate und ähnliches,¹⁾ daß es notwendig erscheint, einige Worte anzufügen.

Die Ammoniumsalze der starken Säuren, und ebenso die Aminosäuren, sind absolut neutrale Körper. Wenn sie bei der Titration gegen sehr schwach saure Indikatoren wie Phenolphthalein oder auch auf Substanzen wie das Magnesiumhydroxyd scheinbar als Säuren wirken, so beruht das darauf, daß die gut dissoziierten Ammoniumsalze durch den Reichtum an NH_4 -Ionen die Dissoziation des entstehenden $\text{NH}_4\text{-OH}$ zurückdrängen, so daß sich dann in der Flüssigkeit nur mehr neutrales NH_3 vorfindet. Je weniger also eine Lösung an Ammonsalz enthält, desto näher rückt der Lackmus- und der Phenolphthaleinumschlag aneinander. Ja, wenn man zu reinem Wasser mit etwas Phenolphthalein verdünnteste Ammoniaklösung zutröpfelt, so tritt der Farbumschlag beider Indikatoren gleichzeitig ein; die Rötung des Phenolphthaleins läßt sich sogar noch früher erkennen, weil eben die ganze Flüssigkeit sich färbt, während das bißchen Ammoniumhydroxyd in dem einen Tropfen auf dem Lackmuspapier der relativ großen Menge des dargebotenen Farbstoffes gegenüber nicht recht zur Wirkung kommen kann.

Interessant ist der Einfluß der Temperatur auf die Behinderung der Ammonsalztitration mit Phenolphthalein. Eine 0,534%ige Lösung von Salmiak ($1/10$ -normal) war (wie alle von mir untersuchten Ammoniumsalzpräparate) auf Lackmus neutral. Bei Zusatz von 0,05—0,2 ccm der Lauge zu 10 ccm der Lösung trat deutlicher Umschlag auf dem glatten Lackmuspapier ein; um das Auftreten der ersten Phenolphthalein-

¹⁾ Einer der neueren Autoren schreibt sich sogar ausdrücklich die Entdeckung des störenden Einflusses der Ammonsalze auf die Titration mit Phenolphthalein zu und verlangt dafür die Priorität.

färbung zu erzielen, mußten 0,35 bis 0,5 ccm der Lösung zugesetzt werden. Dabei zeigten gleichzeitig vorgenommene Parallelproben stets volle Übereinstimmung, während zu verschiedenen Zeiten vorgenommene Proben die erwähnten Schwankungen aufwiesen. Als Ursache der Erscheinung erkannte ich bald den Wechsel der Zimmertemperatur zur Zeit der einzelnen Versuchsreihen. Als Proben in Schnee abgekühlt wurden, trat der Phenolphthaleinumschlag schon bei 0,2 ccm, beim Erwärmen auf etwas mehr als Handtemperatur erst bei 0,9 ccm Laugeverbrauch ein.

Ähnliches konnte ich bei Glykokollösungen beobachten. Die neueren käuflichen Präparate von Aminosäuren scheinen alle auf Lackmus etwas sauer zu reagieren. Als Ursache ist vielleicht die Reinigung der Präparate nach der Fischerschen Methode anzusehen. Ein im Laboratorium vorrätiges altes, prachtvoll krystallisiertes Glykokollpräparat und ebenso ein (valinhaltiges) Leucinpräparat zeigte keinerlei saure Reaktion. Ich verwendete Merksches Glykokoll, das in $\frac{1}{10}$ -normaler Lösung auf Lackmus kaum merklich sauer reagierte. Beim Erwärmen der Lösung auf 40° erschien die Rötung des Lackmus sehr deutlich und um die erste Rötung von Phenolphthalein mußten 0,3 ccm der Lauge zugefügt werden, während bei Zimmertemperatur 0,15 ccm genügten.

Bei verdünnteren Glykokollösungen, ca. 0,2% haltend, tritt der Neutralisationspunkt für Lackmus und für Phenolphthalein praktisch gleichzeitig ein, ein Tropfen der $\frac{n}{14}$ -Lauge ruft ihn schon hervor. Warum ich in meinen Versuchen an Salmiak und an Glykokollösungen zwar im allgemeinen übereinstimmende, im einzelnen aber geringere Werte für den Laugenverbrauch bis zum Auftreten der ersten Rötung von Phenolphthalein verbrauchte, als Sörensen in seinen Versuchen fand, kann ich nicht sagen. Ich habe stets mit derselben Flüssigkeit als Kontrollösung gearbeitet und die erste merkbare Farbenänderung als Umschlag bezeichnet; vielleicht kommt auch die Empfindlichkeit des Auges in Betracht. In bezug auf die Ausführung der weiteren Formoltitrationen führe ich an, daß ich bei den stärkeren Lösungen die mit den berechneten Mengen

besser stimmenden Resultate erhielt, wenn ich vom Lackmus- oder Phenolphthaleinumschlag, der ja sehr nahe beieinander lag, bis zur starken Rötung titrierte. Bei den verdünnteren Lösungen aber, wie sie etwa den Verhältnissen im Harn entsprachen, stimmten die gefundenen Werte besser, ja genau, wenn ich nur bis zum Auftreten der ersten Rötung des Phenolphthaleins nach dem Formalinzusatz titrierte. Glykokoll verbrauchte dabei stets sehr viel Formalin, viel mehr, als die entsprechende Menge von Ammoniak und auch mehr als die Harnflüssigkeit auch bei scheinbar hohem Glykokollgehalt verbrauchte.

Alles zusammenfassend glaube ich behaupten zu können, daß die Formoltitration im Harne von der Phenolphthaleinneutralität ausgehen muß, und daß sie besser nur bis zum Auftreten der schwachen Phenolphthaleinfärbung fortgeführt werden soll. Wenn das geschieht, so zeigen die mir zur Verfügung stehenden normalen Harne einen Glykokollgehalt von 40 mg in 100 ccm Harn. In Rücksicht auf die Ergebnisse der Naphthalinsulfochloridreaktion vermute ich, daß auch dieser Glykokollgehalt nur ein scheinbarer ist, mit anderen Worten, daß die Formoltitration der Aminosäuren im Harne höchstens den Wert einer klinischen Schätzungsmethode beanspruchen kann, für die Entscheidung wissenschaftlicher Fragen aber bisher noch zu wenig ausgebildet ist.
