Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Over het aminozuur-gehalte van het bloed

https://hdl.handle.net/1874/273447

A° 192 192

OVER HET AMINOZUUR-GEHALTE VAN HET BLOED.

K. DE SNOO.

OVER HET AMINOZUUR-GEHALTE VAN HET BLOED.

Boek- en Steendrukkerij Eduard IJdo. — Leiden.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
4036 9559

Diss. Utrecht 1920

Over het aminozuur-gehalte van het bloed.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. H. VISSCHER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 6 JULI 1920, DES NAMIDDAGS TE 2 UUR, DOOR

KLAAS DE SNOO, Arts

GEBOREN TE BRIELLE.



LEIDEN. — EDUARD IJDO. — 1920.

AAN MIJNE OUDERS.

Aan het slot van mijn academische studiën gekomen, biedt het beëindigen van dit proefschrift mij de gelegenheid U, Hoogleeraren en oud-Hoogleeraren der Utrechtsche Medische Faculteit, mijn dank te betuigen, voor het onderwijs, dat ik van U genoten heb.

In het bijzonder wil ik U, Hooggeleerde Ringer, *Hooggeachte Promotor, bedanken voor de leiding en de hulp, die Gij mij bij het bewerken van dit proefschrift gegeven hebt. Dit onderzoek, waardoor Gij mij hebt doen inzien de waarde van schijnbaar onbelangrijke kleinigheden, zal zonder twijfel veel hebben bijgedragen tot mijn medische vorming. De vele uren in Uw laboratorium doorgebracht, reken ik tot de aangenaamste en meest leerzame uit mijn studietijd.*

Ook U, Hooggeleerde Pekelharing, *wil ik bedanken voor de belangstelling, welke Gij in mijn werk steldet.*

De bereidwilligheid, waarmede Gij, Hooggeleerde Zwaardemaker, *mij toestond van verschillende hulpmiddelen uit Uw laboratorium gebruik te maken, stel ik op hoogen prijs.*

Tot mijn leedwezen, is het mij niet meer vergund een woord van dank te brengen aan mijn Hooggeachten leermeester Talma. *Ik acht het eèn voorrecht nog tot zijn leerlingen te hebben behoord. Zijn helder inzicht en oorspronkelijke geest zullen mij in de praktijk van veel nut zijn.*

Ten slotte een woord van dank aan allen, die mij op de een of andere wijze behulpzaam zijn geweest bij het samenstellen van dit proefschrift en het corrigeeren van drukproeven.

INHOUD.

Blz.

INLEIDING 1

HOOFDSTUK I.

Literatuuroverzicht 7

HOOFDSTUK II.

Methodiek.

A. Methode van SÖRENSEN 43
B. Methode van VAN SLYKE 51
C. Methode van BANG 56

HOOFDSTUK III.

Eigen onderzoekingen.

A. Methode van SÖRENSEN 63
B. Methode van VAN SLYKE 74
C. Methode van BANG 84

HOOFDSTUK IV.

Vergelijking der, met de verschillende methoden, verkregen uitkomsten.

I. Methode van SÖRENSEN vergeleken met de methode van VAN SLYKE 97
II. Methode van BANG vergeleken met de methoden van SÖRENSEN en van VAN SLYKE 102

HOOFDSTUK V.

Het amino-stikstof-gehalte van het bloed onder verschillende omstandigheden.

Blz.

I. Invloed van een eiwitrijken maaltijd op het amino-stikstof-gehalte van het bloed bij normale personen 108

II. Het amino-stikstof-gehalte van het bloed onder eenige pathologische omstandigheden 113

Conclusies 124

Stellingen 129

INLEIDING.

Reeds sedert lange jaren is het bekend, dat ons organisme voor een aanzienlijk gedeelte bestaat uit zeer samengestelde, stikstofhoudende verbindingen, welke men eiwitstoffen noemt. Het spreekt wel haast van zelf, dat men zich veel moeite heeft gegeven, deze eiwitstoffen nader te leeren kennen, om hierdoor een beter inzicht te verkrijgen in het wezen van ons organisme.

Beschouwt men toch het eiwit als „het levende" van het organisme, door eiwit te kunnen samenstellen buiten het lichaam, hoopten velen het probleem van „het leven" te kunnen oplossen. Zoo ver is men echter niet gevorderd, zelfs weet men nog niet eens met zekerheid, hoe het eiwitmolecuul is opgebouwd, laat staan, hoe men eigenlijke eiwitstoffen buiten het lichaam, door synthese, zou kunnen samenstellen, terwijl verder ook nog volstrekt onzeker is, of de eiwitstoffen, die wij uit de levende stof kunnen verkrijgen, waarbij deze natuurlijk gedood wordt, wel als zoodanig in de levende stof aanwezig waren.

Bij het onderzoek over „eiwit" bleek aldra, dat dit niet een bepaalde stof van constante chemische samenstelling is; maar dat het een aantal stoffen zijn, welke wel is waar hoofdzakelijk bestaan uit koolstof, waterstof, zuurstof en stikstof, maar dat in de eerste plaats elk dier elementen in telkens weer wisselende hoeveelheden in de verschillende eiwitstoffen voorkomt en dus de verhoudingsgetallen van

de hoeveelheden van deze elementen onderling voortdurend verschillen, terwijl daarenboven ongetwijfeld in vele eiwitstoffen nog allerlei andere elementen, zooals b.v. zwavel en phosphorus, in kleine hoeveelheden voorkomen.

Het zal den lezer waarschijnlijk wel bekend zijn, dat onze groote landgenoot G. J. MULDER, de eerste is geweest, die zich met het stelselmatig onderzoek dier eiwitstoffen heeft beziggehouden. G. J. MULDER meende zeer terecht de eiwitstoffen in één groote groep te moeten onderbrengen. Hij meende dan ook, dat alle eiwitstoffen één gemeenschappelijke kern hadden, waaromheen dan bij de verschillende eiwitstoffen, verschillende groepen gerangschikt zouden zijn, welke dan ook elementen zooals phosphorus en zwavel zouden kunnen bevatten.

Verdere onderzoekingen, vooral door A. KOSSEL, EMIL FISCHER, ABDERHALDEN en vele medewerkers verricht, toonden aan, dat de bouw van het eiwit-molecuul veel samengestelder is, dan MULDER gedacht had. Zij toch slaagden er in, het eiwit-molecuul te doen uiteenvallen in chemisch eenvoudiger verbindingen, waarvan de aard werd vastgesteld. Deze splitsing nu heeft men getracht op verschillende wijzen te bewerken; ten slotte bleek de hydrolyse door koken met sterke minerale zuren het meest geschikt te zijn. Bij deze hydrolyse ontstaan een aantal stikstofhoudende splitsings-producten, waarvan de voornaamsten aminozuren bleken te zijn. Verder kwam aan het licht, dat bij splitsing van verschillende eiwitstoffen, niet steeds dezelfde aminozuren ontstonden en dat hetzelfde splitsingsproduct bij de verschillende eiwitstoffen, telkens weer in andere hoeveelheden aanwezig is.

FISCHER en KOSSEL toonden door schitterende onderzoekingen aan, dat aminozuren de eigenschap bezitten, zich met elkander te kunnen vereenigen, zoodanig, dat de amino-groep

van het één, zich bindt aan de carboxyl-groep van het ander, onder afsplitsing van water. De aldus gevormde stoffen noemde FISCHER peptiden. Ten slotte is het verschillenden onderzoekers gelukt, een aantal polypeptiden op te bouwen. Sommigen daarvan vertoonden een aantal eigenschappen, welke ook aan eiwitstoffen eigen zijn. Zoo verkreeg men met deze polypeptiden meermalen de biureetreactie, de reactie van MILLON, terwijl enkelen door phosphorwolfraamzuur werden neergeslagen.

Ten slotte bleek, dat synthetisch gemaakte polypeptiden, evenals eiwitstoffen, door enzymwerking gesplitst worden in aminozuren, waardoor de theorie, dat het eiwit-molecuul voornamelijk opgebouwd is uit aminozuren, wellicht hoofdzakelijk door peptide-bindingen aan elkaar gekoppeld, zeer aan waarschijnlijkheid wint. Evenwel zonder twijfel komen hiernaast nog tal van andere groepen voor.

Behalve dat het gelukte eiwit te splitsen door koken met minerale zuren, ontdekte men ook, dat eiwit gesplitst kon worden door enzymwerking, waardoor eveneens ten slotte aminozuren kunnen ontstaan. Zoo bleken maagsap, pancreassap en darmsap van verschillende dieren deze enzymen te bevatten en ook in de weefsels komen zij voor.

Alle bovengenoemde onderzoekingen hebben zeer zeker veel bijgedragen tot de kennis van den aard der eiwitstoffen, welke in zooveel verscheidenheid in ons lichaam aanwezig zijn. Neemt men nu in aanmerking, dat het eiwit-molecuul voor een groot gedeelte uit aminozuren is opgebouwd, dan wordt het verklaarbaar, dat de weefsels door de vereischte aminozuren op te nemen, in staat zijn dàt eiwit hieruit te vormen, dat zij noodig hebben.

Het is dus duidelijk, dat aminozuren van het grootste belang zijn voor de eiwitstofwisseling; aan den eenen kant toch worden de met het voedsel opgenomen eiwitstoffen in

het spijsverteringskanaal meer en meer ontleed tot aminozuren, welke dan worden opgenomen, aan den anderen kant bouwt ons organisme hieruit op het benoodigde lichaamseiwit; verder kunnen ook in de weefsels aminozuren vrijkomen, welke daar door proteolytische enzymen uit lichaamseiwit gevormd worden.

Voor het verkrijgen van een goed inzicht in de stofwisseling der eiwitstoffen is het dus noodig om het gehalte van het bloed aan aminozuren onder allerlei omstandigheden goed te kennen. Dan toch zou het mogelijk zijn te bewijzen, dat werkelijk aminozuren vanuit den darm in het bloed overgaan, terwijl aan den anderen kant ook nagegaan zou kunnen worden, de voortdurende wisselwerking tusschen organen en bloed, wat betreft den opbouw of de ontleding van eiwit in die organen.

Zonder twijfel is dus het onderzoek van het bloed op aminozuren van het grootste belang voor de kennis van de eitwitstofwisseling zoowel onder normale als onder pathologische omstandigheden. Men denke b.v. aan de rol, die de lever vervult bij de assimilatie der eiwitstoffen en de stoornissen, die hierin bij ernstige aandoeningen van dit orgaan reeds zijn waargenomen (tyrosine en leucine in de urine bij acute leveratrophie en phosphorusvergiftiging).

Na vele onderzoekingen, die het waarschijnlijk maakten, dat aminozuren in het bloed aanwezig zouden zijn, is het ten slotte gelukt deze stoffen erin aan te toonen en het gehalte van het bloed aan aminozuren en mogelijk aanwezige peptiden te bepalen.

De methoden, hiervoor aangegeven, zijn die van SÖRENSEN, VAN SLYKE en BANG. De eerste berust op het feit, dat de amino-groep van aminozuur en peptiden met formol een verbinding aangaat, waardoor haar basische eigenschappen verdwijnen en de zure eigenschappen der carboxylgroep te

voorschijn komen; door de aldus gevormde zure stof met behulp van loog te titreeren, kan men de hoeveelheid aanwezige amino-stikstof bepalen. De tweede methode berust hierop, dat de amino-groep met salpeterigzuur reageert onder afsplitsing van stikstof; door de hoeveelheid ontwikkelde stikstof te meten, heeft men wederom een middel om amino-stikstof te bepalen. Met deze twee methoden bepalen wij dus, hoeveel amino-groepen aanwezig zijn. Daar nu bijna alle bekende eenvoudige amino-stikstof houdende verbindingen met één amino-groep reageeren (de α-groep), krijgen wij hierdoor dus een goeden indruk omtrent de hoeveelheid der aanwezige aminozuur-moleculen, terwijl de aard der aminozuren ons echter onbekend blijft. Bepaalt men dus met deze beide eerste methoden de amino-stikstof der aminozuren, met de derde methode bepaalt men de totale rest-stikstof — (ureum-, + ammoniakstikstof.) Alle stikstof aanwezig in de totale rest-stikstof behalve die afkomstig van ureum en ammoniak, wordt hierbij dus op rekening gesteld van de aminozuren, terwijl van de aminozuren zelf niet alleen de stikstof, in de amino-groep aanwezig, bepaald wordt, maar ook de stikstof welke in andere bindings-vormen in het aminozuur-molecuul aanwezig is. Kan men dus verwachten, dat de methode van SÖRENSEN en die van VAN SLYKE gelijkwaardige uitkomsten geven, de methode van BANG moet zeker uitkomsten geven, die hooger zijn dan die, verkregen met de beide eerstgenoemden, hetgeen ook uit de opgaven in de literatuur vermeld, blijken zal.

De bepaling van aminozuren in het bloed heeft echter eigenaardige moeilijkheden. In de eerste plaats moet het eiwit verwijderd worden en het is begrijpelijk, dat de middelen hiertoe aangewend van belang zijn, daar het niet buitengesloten is, dat door de verschillende gebruikte

middelen, aminozuren worden neergeslagen. In de tweede plaats is van belang de behandeling, die het van eiwit bevrijde bloed moet ondergaan, alvorens tot een aminozuur-bepaling kan worden overgegaan, daar hierbij voor de verschillende methoden verschillende stoffen verwijderd moeten worden.

Zien wij dan ook de uitkomsten der onderzoekers, dan krijgen wij een aantal cijfers te zien, welke moeilijk of niet met elkaar kunnen worden vergeleken, daar de verschillende onderzoekers met bloed van verschillende dieren werkten, de ééne arteriëel, de ander veneus bloed onderzocht, de voedingstoestand der dieren verschillend was en ten slotte verschillende methoden gebruikt werden. Wel hebben eenige onderzoekers de methoden van SÖRENSEN en van VAN SLYKE naast elkaar gebruikt, doch zij vermelden niet, of hiermee gelijkwaardige uitkomsten verkregen zijn.

Ten slotte kan ik vele van de opgegeven waarden niet beoordeelen, daar meestal geen nauwkeurige beschrijving van de gevolgde methodiek is gegeven.

Het kwam mij daarom gewenscht voor, de waarde der verschillende methoden eens nauwkeurig na te gaan, de uitkomsten daarmede verkregen met elkaar te vergelijken en het aminozuur-gehalte van het bloed na te gaan onder verschillende physiologische en pathologische omstandigheden.

HOOFDSTUK I.

Literatuuroverzicht.

De arbeid van degenen, die zich hebben bezig gehouden met de vraag wat er met de eiwitstoffen van het voedsel in ons organisme gebeurt, heeft aan het licht gebracht, dat eiwitstoffen in den darm afgebroken worden en dat naast albumosen en peptonen ook vrije aminozuren als eindproducten van die afbraak ontstaan.

Was dus de mogelijkheid gegeven, dat deze aminozuren van uit het darmlumen in het bloed zouden overgaan, moeilijkheden van technischen aard maakten, dat het langen tijd duurde alvorens men dit met zekerheid kon aantoonen. Om genoemde redenen wordt het begrijpelijk, dat men langen tijd gestreden heeft over de vraag of eiwit als zoodanig, dan wel zijn afbraakproducten, in casu de aminozuren, van uit den darm door het bloed worden opgenomen.

Wie dan ook zich tot taak heeft gesteld een onderzoek aan te vangen naar het voorkomen van aminozuren in het bloed onder verschillende omstandigheden, zal bij zijn studie van de literatuur allereerst aantreffen een groot aantal onderzoekingen over resorptie van eiwitstoffen.

Ten slotte behoeft het wel geen betoog, dat de opvattingen, welke men huldigde omtrent deze resorptie, ten nauwste samenhingen met de kennis, welke men verkreeg door de vertering van het eiwit door de spijsverteringssappen te bestudeeren.

Zoo vinden wij, dat reeds in 1869 BRÜCKE 1) de opvatting toegedaan was, dat eiwit zonder scheikundige veranderingen te ondergaan, den darmwand passeerde. Steun aan deze opvatting gaven de onderzoekingen van C. VOIT en J. BAUER 2), die aantoonden, door hongerende honden, welke in stikstofevenwicht waren, kippeneiwit in het rectum te spuiten, dat na deze inspuiting het stikstofgehalte van de urine verhoogd was, waaruit zij besluiten, dat inderdaad eiwit geresorbeerd moet zijn.

Daar zij 't tevens onwaarschijnlijk vinden, dat in het onderste deel van den dikken darm nog verteringsenzymen voorkomen, nemen zij aan, dat dit eiwit zonder veranderingen te ondergaan, door het rectumslijmvlies is opgenomen.

Behalve deze verklaring van VOIT en BAUER over het toenemen van de stikstofafscheiding (ureum) in de urine, lijkt mij de mogelijkheid niet buitengesloten en lijkt het mij zelfs zeer waarschijnlijk, dat deze stikstofvermeerdering niet afkomstig is van geresorbeerd eiwit, maar van ammoniak, dat zich in het rectum gevormd heeft door rotting. Bij een hunner proeven geven zij zelfs op, dat de ontlasting, welke eenige uren na het clysma met kippeneiwit tevoorschijn kwam, zeer sterk stonk, wat dus wel op een sterk rottingsproces wijst.

Verder gingen VOIT en BAUER nog de resorptie na van eiwit uit den dunnen darm. Zij gingen hierbij als volgt te werk. Bij een hond werd de buikholte geopend en een dunne darmlis naar buiten gebracht. Deze werd aan beide einden dicht gebonden en in het zoo ontstane afgesloten lumen een eiwitstof gebracht. Vervolgens werd de darm weer in de buikholte gebracht en de buikwand gesloten.

Na 1 tot 4 uur werd het beest gedood en het darmstuk uit de buikholte verwijderd om den inhoud te kunnen onderzoeken. 't Bleek nu, dat in dien tijd belangrijke hoeveel-

1) Sitz. Berichte der Wiener Acad. **59** II, 617; 1869.
2) Zeitschr. für Biologie **5**, 536; 1869.

heden eiwit uit het darmlumen verdwenen, zonder dat in de rest afbraakproducten van eiwit aantoonbaar waren. Daar door het afbinden van den darm maag- noch pancreassap kunnen toetreden en men over de werking van het darmsap nog geen, of in elk geval zeer tegenstrijdige gegevens had, besloten VOIT en BAUER hieruit, dat eiwit als zoodanig van uit den darm geresorbeerd wordt.

Eenige jaren later herhaalden CZERNY en LATSCHENBERGER 1) bovengenoemde proeven en verkregen dezelfde resultaten. Hieruit meenden ook zij te kunnen besluiten, dat eiwit als zoodanig door den darmwand geresorbeerd wordt.

Als gevolg van bovengenoemde opvatting, n.l. dat eiwit rechtstreeks van uit den darm in het bloed zou overgaan, trachtte men aan te toonen, dat dit direct in de bloedbaan gebracht, door het organisme geassimileerd kan worden. Zoo spoot NEUMEISTER 2) een hond groote hoeveelheden acid-albumine en alcali-albuminaat (verkregen door koken van eiwit resp. met minerale zuren en basen) in het bloed, zonder dat deze door de urine werden afgescheiden. Hij meende hieruit te kunnen besluiten, dat dit eiwit inderdaad door het organisme wordt geassimileerd.

STOKVIS 3) echter toonde aan, dat kippeneiwit, zelfs in zeer kleine hoeveelheden in de bloedbaan gebracht, reeds aanleiding gaf tot albuminurie, terwijl deze ook werd waargenomen, wanneer zeer veel rauwe eieren ineens werden gebruikt. Kippeneiwit moet dus eerst een verandering in den darm ondergaan, alvorens het door het lichaam geassimileerd kan worden.

Velen zijn de onderzoekers, die zich met het vraagstuk der resorptie van eiwit hebben beziggehouden, terwijl de uit-

1) VIRCHOW's Archief **59**, 161; 1874.
2) Zeitschr. für Biologie. **27**, 309; 1890.
3) Ned. Tijdschr. voor Gen. **6**, 395; 1862.

komsten van hun onderzoekingen wisselend waren. Zoo besluiten SENATOR 1) en BUNGE 2) uit hun onderzoekingen, dat alleen eiwit, hetwelk zich normaliter in het bloed bevindt, direct in de bloedbaan ingespoten kan worden, zonder dat albuminurie tevoorschijn komt, terwijl eiwit, hetwelk normaliter niet tot het plasma behoort (zooals kippeneiwit en caseïne) bij intraveneuse injectie aanleiding geeft tot het ontstaan van albuminurie.

NEUMEISTER daarentegen neemt aan, dat gedenatureerd eiwit van welken oorsprong ook, wanneer in de bloedbaan gebracht, door het organisme geassimileerd kan worden.

FRIEDENTHAL en LEWANDOWSKY 3) trachtten deze tegenstrijdige uitkomsten te verklaren door de mogelijkheid aan te nemen, dat sommige eiwitstoffen een vergiftige werking op het organisme oefenen. Ook zij namen proeven en slaagden er in de meest verschillende eiwitstoffen in het bloed te brengen, zonder albuminurie te verwekken, indien zij de voorzorg namen deze stoffen eerst te verhitten tot 60 graden.

I. MUNK en LEWANDOWSKY gaven zich eveneens moeite om klaarheid te brengen in dit vraagstuk en toonden aan, dat de snelheid van inspuiting van de eiwitstoffen in het bloed van groot belang is voor het ontstaan van albuminurie. Spoten zij het eiwit zoo langzaam in, dat de omstandigheden vergelijkbaar werden met wat tijdens de digestie plaats heeft, dan vonden zij geen albuminurie.

Meende men dus te hebben aangetoond, dat eiwit, onmiddellijk in de bloedbaan gebracht, door het organisme geassimileerd wordt, 't bewijs dat dit onder normale omstandigheden met het eiwit van ons voedsel het geval is, was niet geleverd.

---

1) Die Albuminurie in physiol. u. klin. Beziehung, Berlin 1890.
2) Lehrbuch der physiol. Chemie 1889; blz. 311.
3) Arch. f. Anatomie u. Physiologie 531; 1899.

BORCHHARDT 1) trachtte dit vraagstuk tot nadere oplossing te brengen door groote hoeveelheden gemakkelijk aantoonbare eiwitstoffen in den darm te brengen, ten einde deze later in het bloed te kunnen terugvinden. Hij bediende zich hiervoor van hemiëlastine en het eiwit van BENCE JONES en slaagde er ook in, deze in het bloed terug te vinden.

ABDERHALDEN 2), die deze proeven herhaalde, echter alleen met elastine, vermocht deze stof niet in het bloed aan te toonen.

Eveneens negatieve uitkomsten verkregen MENDEL en ROCKWOOD 3), die in plaats van elastine, caseïne en edestine (een eiwitstof uit hennep) voor hun waarnemingen gebruikten. Zij spoten deze eiwitstoffen in een aan beide einden toegebonden, van te voren goed gereinigd, stuk van den dunnen darm, maar konden na eenige uren noch elastine, noch caseïne in het bloed aantoonen.

Op geheel andere wijze hebben ASCOLI en VIGNO 4), GANGHOFNER en LANGER en anderen getracht om bovengenoemd vraagstuk op te lossen. Uitgaande van het feit, dat eiwit in het bloed gebracht, aanleiding geeft tot het ontstaan van verschillende stoffen, o.a. die dit eiwit neerslaan, de z.g. praecipitinen, hebben bovengenoemde onderzoekers hiervan gebruik gemaakt om aan te toonen, dat werkelijk onveranderd eiwit den darmwand passeert.

ASCOLI en VIGNO kregen wisselende uitkomsten, nu eens werden wel, dan weer geen praecipitinen gevonden, zoodat zij geen conclusie durfden trekken. Evenmin konden DEBRÉ en PORAK 5) praecipitinen in het bloed aantoonen, nadat zij dagelijks, gedurende eenige weken, paarden-serum in den dikken

---

1) Zeitschr. für physiolog. Chem. **51**, 506; 1907 en **57**, 305; 1908.
2) ibid. **69**, 301; 1910.
3) Americ. Journ. of Physiolog. **12**, 336; 1905.
4) Zeitschr. für physiolog. Chem. **39**, 283; 1903.
5) Journ. de Physiol. et de Path. gén. **14**, 1019; 1912.

darm spoten. Gingen zij echter uit van specifieke praecipitinen, dan gelukte het, in het bloed voedseleiwit aan te toonen.

PFEIFFER bracht gedurende 7 dagen kippeneiwit in den dikken darm, maar kon aan 't eind van deze periode geen specifieke praecipitinen in het bloed aantoonen.

Eveneens negatieve resultaten verkreeg ABDERHALDEN [1]) en zijn medewerkers.

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat de meeste onderzoekers het niet waarschijnlijk achten, dat onder normale omstandigheden voedseleiwit onveranderd den darmwand passeert.

Wel had men gezien, dat onder abnormale omstandigheden dit 't geval kan zijn. Bij 't toevoeren van groote hoeveelheden kippeneiwit werd, zooals reeds gezegd, een deel hiervan onveranderd door de urine afgescheiden, zoomede bleek de darm van volwassen personen onder pathologische omstandigheden en van pasgeborenen, zooals GANGHOFNER en LANGER [2]) aantoonden, voor eiwit doorgankelijk.

Intusschen hadden onderzoekingen over de vertering van eiwit aan 't licht gebracht, dat met het voedsel opgenomen eiwit, door de verschillende proteolytische enzymen van maag en darm, een splitsingsproces ondergaat. Zoo werd achtereenvolgens aangetoond de werking van pepsine en trypsine, terwijl COHNHEIM [3]) na de ontdekking van de erepsine kon aantoonen, dat aminozuren als laatste eindproducten der eiwitvertering zijn te beschouwen. 't Lag nu voor de hand na te gaan of de afbraakproducten dezer vertering in de bloedbaan waren terug te vinden en voornamelijk liep dan de vraag hierover of de meer samengestelde, chemisch dichter bij het eiwitmolecuul staande splitsingsproducten, zooals albumosen en peptonen, dan wel de verder van het eiwitmolecuul afstaande, chemisch

[1]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **51**, 269; 1907.
[2]) Münch. med. Wochenschr. **51**, 1497; 1904.
[3]) Zeitsch. für physiolog. Chem. **33**, 451; 1902.

eenvoudiger verbindingen, c.q. de aminozuren, van uit den darm in het bloed overgaan.

Ten einde deze moeilijke vraag op te lossen trachtte men deze stoffen terug te vinden in het van eiwit zooveel mogelijk bevrijde bloedserum. Dit van eiwit bevrijde deel van het bloedserum bevat stikstofhoudende bestanddeelen, welke bij chemische analyse nog een hoeveelheid stikstof leveren, die men de totale reststikstof (R. N.) van het bloed pleegt te noemen.

Vele onderzoekers hebben zich met het onderzoek naar de bestanddeelen, die deze reststikstof leveren, beziggehouden, terwijl de uitkomsten dier onderzoekingen sterk wisselden. Dit is wel gelegen in het feit, dat het zeer moeilijk is, het eiwit volledig uit het bloed te verwijderen en dat volgens ééne methode werkende, andere stoffen neergeslagen worden dan volgens een andere, zoodat het onderzoek der R.N. geheel verschillende uitkomsten oplevert, al naar gelang de methode welke gebruikt is. Weet men verder nog, dat de begrippen albumosen en peptonen niet scherp omlijnd zijn, zoodat wat de een tot de albumosen, de ander tot de peptonen rekent en omgekeerd, dan wordt het duidelijk, dat bij de verschillende gebruikte methoden, de één meende met albumosen te maken te hebben, terwijl de ander hierin peptiden of niet gecoaguleerd eiwit zag. Bedenkt men ten slotte nog, dat de R. N. leverende stoffen bestaan uit verschillende componenten en dat deze slechts in geringe hoeveelheid in het bloed aanwezig zijn, dan hebben we hier wel de voornaamste oorzaken, die het onderzoek der R. N. van het bloed zoo ingewikkeld maken.

Verschillende onderzoekers hebben nu bepalingen gedaan over deze R. N. bij verschillende voedingstoestanden van het proefdier en zich tevens veel moeite gegeven de verschillende componenten er van te leeren kennen.

Zoo bepaalden v. BERGMAN en LANGSTEIN 1) de R.N. van het bloed van honden na een eiwitrijken maaltijd en na een stikstofvrije voeding. In het eerste geval vonden zij hiervoor een hoogere waarde dan in het tweede. Ten einde iets te weten te komen over de componenten dezer R. N., werd als volgt te werk gegaan: Een groote hoeveelheid bloed, verkregen door het proefdier te dooden, werd bij een 12-voudige hoeveelheid kokend water, dat een half percent primair natriumphosfaat bevatte, gevoegd. Vervolgens werd verhit tot het mengsel weer kookte, waarna met azijnzuur aangezuurd werd. Hierna werd gefiltreerd en het filtraat ingedampt tot op $^1/_7$ van het oorspronkelijke bloedvolumen. 't Filtraat was vrij sterk gekleurd en gaf een duidelijke biureetreactie en die van MILLON. Hiervan werd nu het stikstofgehalte bepaald, hetwelk dan de totale R. N. zou zijn. Het aldus ingedampte filtraat werd nu behandeld met 96 percent alcohol, waardoor een neerslag ontstond, dat in water oplosbaar bleek te zijn en een sterke biureetreactie gaf. Schrijvers van dit artikel beschouwen dit neerslag als albumosen en bepaalden ook hiervan het stikstofgehalte.

Het filtraat verkregen na de behandeling met alcohol, werd nu geheel verzadigd met zinksulfaat, aangezuurd en bleef 2-maal 24 uur staan, waarna gefiltreerd werd. Aan het aldus verkregen filtraat werd nu phosphorwolfraamzuur toegevoegd, waardoor de peptonen neerslaan.

Op deze wijze te werk gaande, vonden v. BERGMAN en LANGSTEIN, dat het bloed van hongerende en goed gevoede dieren zoowel albumosen als peptonen bevat.

Zij vonden in het bloed der goed gevoederde honden, dat ongeveer 25 percent van de totale R. N. door albumosen werd geleverd, terwijl de totale R.N., verminderd met de albumosen-

---

1) Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **6**, 27; 1905.

hongerende dieren waren deze getallen resp. 9 en 45 percent. Daar deze proeven niet met hetzelfde dier konden genomen worden, hebben deze geen vergelijkende waarde, maar de stikstof voor ongeveer 55 percent uit peptonen bestond; bij groote verschillen in uitkomsten wijzen in de richting van de mogelijkheid, dat albumosen, resp. peptonen tijdens de digestie in het bloed worden opgenomen.

Ook Morawitz en Dietschy 1) hebben getracht albumosen in het bloed aan te toonen. Het bloed werd van eiwit bevrijd door het met de 20-voudige hoeveelheid physiologische keukenzoutoplossing, welke met primair kaliumphosfaat zuur was gemaakt, tot 80 graden te verhitten. Hierna werd gefiltreerd en om uit het filtraat de laatste resten eiwit te verwijderen, nog eens gedurende 6 uur verhit met 96 percent alcohol. Hierna werd wederom gefiltreerd en verzadigd met zinksulfaat, waarna gefiltreerd werd. In het laatste verkregen neerslag werd nu op albumosen resp. peptonen gereageerd met de biureetreactie, terwijl ook het neerslag, verkregen door het koken met alcohol, uitgewasschen werd met water en dit waschwater op albumosen werd onderzocht. Gingen schrijvers nu uit van totaal-bloed, dan werd steeds een positieve biureetreactie gevonden, gingen zij daarentegen uit van serum, dan was de reactie steeds negatief. Eenmaal slechts verkregen zij, uitgaande van serum, een positief resultaat. In dit geval was het serum echter sterk haemolytisch. Uit deze proeven besluiten Morawitz en Dietschy, dat de biureetreactie gevende stoffen, die zij verkrijgen uitgaande van totaal-bloed, afkomstig zijn niet uit het plasma, maar uit de roode bloedlichaampjes, zoodat niet de albumosen maar de haemoglobine (of bij de behandeling daaruit ontstane globine) voor de biureetreactie verantwoordelijk moet worden

---

1) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmac. **54**; 1905.

gesteld. In deze meening werden zij nog versterkt, doordat, uitgaande van een oplossing van haemoglobine, hetzelfde resultaat werd verkregen. Tenslotte wijzen zij er nog op, dat de biureetreactie niet specifiek is voor albumosen.

Het verschil in uitkomsten tusschen de onderzoekingen van v. BERGMAN en LANGSTEIN aan den eenen kant en MORAWITZ en DIETSCHY aan den anderen kant, is zonder twijfel gelegen in de methodiek. Beschouwen wij de eerste bewerking, coagulatie in de hitte bij zwak zure reactie, in beide gevallen als gelijkwaardig, het groote verschil komt bij de behandeling met alcohol. De eersten toch vermengen het van eiwit bevrijde, echter sterk gekleurde filtraat, wat er op wijst dat de coagulatie niet volledig is geweest, met een hoeveelheid alcohol en lossen het daardoor verkregen neerslag op in water, waardoor het heel goed mogelijk is, dat naast albumosen ook eiwit, dat wel door den alcohol neergeslagen, maar nog niet gecoaguleerd is, mee in oplossing gaat, terwijl de laatste onderzoekers gedurende 6 uur koken met alcohol, waardoor het aanwezige eiwit wèl volkomen gecoaguleerd wordt. Ik geloof dan ook, dat de biureetreactie, welke v. B. en L. verkregen, niet het gevolg is van de aanwezigheid van albumosen, maar veel meer te wijten is aan een onvoldoende verwijdering van het eiwit. Tevens blijkt uit bovenstaande het verschil in inzicht, dat bestaat over de eigenschappen der albumosen. Terwijl v. B. en L. de albumosen neerslaan met alcohol, beschouwen M. en D. deze stoffen te zijn oplosbaar in alcohol. In hun artikel vermelden zij echter, dat sommige albumosen door alcohol neergeslagen kunnen worden.

Een der eersten wel, die in het bloed naar de hooge splitsingsproducten gezocht heeft was PEKELHARING 1), die reeds in 1881, op voor dien tijd oorspronkelijke wijze aan-

---

1) PFLUGER's Archief **26**, 520; 1881.

toonde, dat het arteriëele bloed van honden, door voedering der dieren met eiwit, rijker aan pepton (dat zijn in dit geval albumosen) werd, terwijl het veneuse bloed veel minder van deze stof bleek te bevatten, waaruit hij besluit, dat de weefsels in staat zijn, pepton aan de circulatie te onttrekken en dat dit pepton door den darmwand geresorbeerd wordt.

Vele onderzoekingen zijn er nu verricht om vast te stellen of albumosen in het bloed voorkomen, waarbij NEUMEISTER 1), ABDERHALDEN 2), FUNK, London 3), en RONA 4) geen, KNOOP 5), TÖPFER 6), KRAUS 7) en FREUND 8) wel deze stoffen meenden te kunnen aantoonen.

Teneinde een meer duidelijk inzicht te krijgen in de verschillende bestanddeelen van de R. N., deden HOHLWEG en MEIJER 9) het volgende onderzoek, waarbij vooral aan de totale verwijdering van het eiwit veel zorg werd besteed. Dit geschiedde door bij zwak zure reactie half te verzadigen met keukenzout. Zij gebruikten bloedserum, dat zoo weinig mogelijk haemolytisch was. Nadat het eiwit aldus gecoaguleerd was, werd gefiltreerd en het stikstofgehalte van het filtraat bepaald, hetgeen dus de totale R. N. was. Dit filtraat werd nu behandeld met tannine, waardoor albumosen en peptonen neergeslagen worden en in de rest werd het ureumgehalte bepaald. Op deze wijze werd nu het bloed onderzocht van goed gevoede en van hongerende honden. Evenals andere onderzoekers, vinden HOHLWEG en MEIJER een verhooging van de totale R. N. na vleeschvoe-

---

1) Zeitschr. für Biologie. **27**, 309; 1890.
2) Zeitschr. für physiolog. Chem. **42**, 155; 1904.
3) ibid. **51**, 269; 1907. 4) ibid. **53**, 309; 1907.
5) Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **3**, 52; 1903.
6) Zeitschr. für experim. Path. u. Therap. **3**, 45; 1905.
7) ibid. **3**, 52; 1905. 8) ibid. **4**, 1; 1906.
9) Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **9**, 381; 1908.

ding. Als gemiddelden vinden zij tijdens honger 52.5 mgr. R. N. op 100 cc. bloed en tijdens eiwitvoeding 78.8 mgr. 't Bleek verder, dat het voornaamste bestanddeel van deze R. N. het ureum was, dat tijdens honger 38.4 mgr. en na vleeschvoeding 56.7 mgr. bedroeg. De stijging van het ureumgehalte is dus na vleeschvoeding ongeveer 50 percent, terwijl zoowel tijdens honger als bij een eiwitrijke voeding 75 percent van de totale R. N. uit ureum bestaat. Wat de stoffen betreft, welke niet door tannine worden neergeslagen en afgezien van ureum, deze vertoonen een vermeerdering der stikstofwaarde van 82 percent, terwijl bij de wel door tannine neergeslagen stoffen (albumosen en peptonen) geen constante vermeerdering viel waar te nemen. De uitkomsten dezer belangrijke onderzoekingen vatten de schrijvers als volgt samen: „Die Bedeutung dieses Verhaltens ist insofern nicht leicht zu beurteilen als die Natur der in diesen Fraktionen enthaltenen Stoffe nicht genügend ermittelt ist. Doch ist sicher, dasz in der Tannin-fällbaren Fraction etwa vorhandene Albumosen, in der nicht fällbaren die Aminosaüren und sonstigen nicht durch Tannin fällbaren Endproducte (von Harnstoff abgesehen) fällen müszen. Da eine konstante Vermehrung der Albumosenfraction nicht nachweisbar ist, wird man nicht wohl eine Vermehrung der Albumosen ähnlichen Stoffen beim verdauenden Tiere annehmen. Die Anwesenheit der geringen Menge von Biuretreaction gebenden Stoffen im Serum, an der wir auf Grund unserer Versuche festhalten müszen, steht sonach mit der Eiweiszresorption nicht in einem erkennbaren Zusammenhang. Auch darf es nicht als ausgemacht angesehen werden, dasz die Biuretreaction gebenden Körper der Verdauungsalbumosen angehören, da es sich auch um Albumosenähnliche Stoffwechselproducte anderer Art handeln könnte".

De regelmatige vermeerdering der R. N. fractie na

vleeschvoeding, welke niet door tannine wordt neergeslagen en afgezien van ureum, doet bij schrijvers de vraag rijzen of hier geen transport van eindproducten der eiwitvertering van den darm naar de weefsels plaats heeft. Deze stoffen zouden dan waarschijnlijk aminozuren moeten zijn, daar deze, zooals bekend, tijdens de digestie in het darmkanaal ontstaan. Om hieromtrent nadere gegevens te verkrijgen, voerden HOHLWEG en MEIJER honden groote hoeveelheden Witte-pepton, dat gedurende 6 weken was blootgesteld geweest aan de werking van trypsine, waardoor dit pepton voor een groot gedeelte ontleed was geworden in aminozuren.

In de eerste plaats werd nu vastgesteld bij een hond, hoe groot de R. N. fractie van 100 cc. bloed was, welke niet door tannine werd neergeslagen en geen ureum was. Dit getal was 6 mgr.

Na voedering van bovengenoemd mengsel bleek deze fractie van de R. N. 16 mgr. in 100 cc. bloed te bedragen.

Schrijvers meenen hieruit te moeten besluiten, dat deze verhooging te gering is om aan te nemen dat werkelijk aminozuren geresorbeerd zijn. Mijns inziens ten onrechte. Een verhooging van 250 percent lijkt mij, hoe klein de absolute getallen ook zijn, voldoende om aan te nemen, dat zeer lage splitsingsproducten, in casu aminozuren, van uit den darm in het bloed zijn opgenomen. Behalve deze proeven werd ook nagegaan of hoogere eiwitsplitsingsproducten, zooals albumosen, geresorbeerd konden worden. Daartoe bepaalde men eerst de albumosenfractie van de R. N. (door tannine neergeslagen) bij hongerende en daarna bij met albumosen gevoede dieren. Het bleek dan, dat deze fractie na voedering verhoogd was met 40 percent (van 5 mgr. in 100 cc. bloed op 8 mgr.).

Uit bovenstaande proeven blijkt dus, dat na vleeschvoeding het R. N. gehalte van het bloed verandert en wel in dien zin,

dat dit gehalte verhoogd is; dat deze verhooging voor een gedeelte moet toegeschreven worden aan een vermeerdering van ureum, maar dat daarnaast ook nog eene vermeerdering is van andere stoffen, welke voor een klein deel bestaan uit de hoogere splitsingsproducten van het eiwitmolecuul, zooals albumosen en peptonen, maar dat de grootste verhooging dezer fractie geleverd wordt door stoffen, welke niet door tannine worden neergeslagen en opgevat worden als te zijn de lagere splitsingsproducten van het eiwit, zooals deze in den darm voorkomen, dus waarschijnlijk aminozuren.

Cathcart en Leathes 1), die eveneens bepalingen deden van de R. N. van het bloed, komen tot dezelfde resultaten als Hohlweg en Meijer, maar konden evenmin aantoonen, dat het werkelijk aminozuren zijn, die bij eiwitvertering in de circulatie worden opgenomen.

Wel had Cohnheim 2) reeds in 1902 aangetoond, dat het mogelijk was, dat bij den Octopus aminozuren van den darm door het bloed worden opgenomen. Hij nam daartoe den darm met de spijsverteringsklieren uit het lichaam weg en hield deze gedurende 20 uur levend in met zuurstof doorstroomd bloed. Bracht hij nu in den uitgesneden darm een pepton-oplossing, dan kon hij na 20 uur in het omringende bloed verschillende aminozuren, zooals tyrosine, lysine en arginine aantoonen, terwijl het ammoniak-gehalte van het bloed aan het einde der proef belangrijk verhoogd bleek te zijn. Eenige jaren later 3) herhaalde hij deze proeven bij een visch, maar vond in het omringende bloed geen aminozuren, maar wel een sterke verhooging van het ammoniak-gehalte, waaruit hij besluit, dat het mogelijk is, dat aminozuren in den

---

1) Journal of Physiology **33**, 463; 1906.
2) Zeitschr. für physiolog. Chem. **35**, 396; 1902.
3) ibid., **59**, 246; 1909.

darmwand gedesamideerd worden en in ammoniak en een nog onbekende stof uiteenvallen.

Steun aan deze opvattingen gaven onderzoekingen van PAVLOW, ZALESKI, NENCKI en SALASKIN 1), die in het portale bloed van den hond na eiwitvertering een verhooging van het ammoniak-gehalte vonden, welke verhooging niet in het arteriëele bloed was terug te vinden. Eenige jaren later toonden FOLIN en DENIS 2) aan, dat deze ammoniak niet afkomstig is van gedesamideerde aminozuren, maar ontstaat in den darm door rottingsprocessen.

Bij de proeven van bovengenoemde onderzoekers bleef, nadat de eiwitachtige stoffen neergeslagen waren, een stikstofhoudende rest over, waarbij het waarschijnlijk leek, dat aminozuren aanwezig waren, zonder dat het evenwel gelukte, deze stoffen aan te toonen.

Wel hadden in 1903 FISCHER en BERGELL 3) eene methode gepubliceerd, om met behulp van β-naphtaline-sulfochloride aminozuren aan te toonen. Deze stof geeft, wanneer bij alcalische reactie met aminozuren geschud, goed gekarakteriseerde verbindingen daarmee in den vorm van β-naphtaline-sulfoaminozuren.

EMBDEN en REESE 4) gebruikten deze reactie om aminozuren in de urine aan te toonen, waarbij bleek, dat vooral de mate der alcalische reactie van groot belang is, om alle aminozuren als β-naphtaline-sulfo-verbindingen uit de urine te verwijderen. Voor hun onderzoek werd de urine eerst van hippuurzuur bevrijd en vervolgens 2-maal 24 uur bij 30° met β-naphtaline-sulfochloride geschud, terwijl van tijd tot tijd de reactie gecontroleerd en alcalisch gehouden werd. Een

---

1) Zie hiervoor bij COHNHEIM l. c.
2) Journal of Biolog. Chem. **11**, 161; 1912.
3) Berichte der deutschen Chem. Gesellschaft **35**, 1903.
4) Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **7**, 41; 1906.

nadere qualitatieve analyse van het aldus verkregen mengsel slaagde gebrekkig.

In aansluiting aan deze proeven trachtte HOWELL 1) nu in het dialysaat van bloedserum met behulp van bovengenoemde stof aminozuren aan te toonen. Hij verkreeg een sterk oliehoudend praecipitaat, niet geschikt voor verder onderzoek. Wel bleek, dat dit praecipitaat, verkregen uit bloed van met vleesch gevoede honden grooter was dan dat, verkregen uit bloed van hongerende beesten. Groote beteekenis heeft dit laatste echter niet, daar door de verontreinigingen een eenigszins nauwkeurige weging niet mogelijk was en de uitkomsten schattenderwijs zijn vastgesteld. Het eenige wat deze proeven ons leeren is, dat er in het bloed stoffen aanwezig zijn, welke met β-naphtaline-sulfochloride reageeren.

Was het dus niet gelukt om onder normale omstandigheden aminozuren met zekerheid in het bloed aan te toonen, onder pathologische omstandigheden gelukte dit wel. Zoo vonden NEUBERG en RICHTER 2) in het bloed van een lijder aan acute gele leveratrophie belangrijke hoeveelheden dezer stoffen. Nadat het bloed van dezen patiënt een nacht in de ijskast had gestaan, vonden zij er den volgenden morgen een groot aantal kristallen in, welke bij nader onderzoek bleken te bestaan uit tyrosine. In 345 cc. bloed, welke zij tot hunne beschikking hadden, konden zij niet minder dan 2.13 gr. tyrosine aantoonen. Daar zij in het bloed geen proteolytische enzymen konden aantoonen, de ureum-afscheiding in de urine niet verhoogd was, hetgeen niet wijst op een verhooging der eiwitstofwisseling en een berekening leerde, dat deze geweldige hoeveelheid tyrosine niet ontstaan kon zijn uit leverweefsel, dat door het ziekteproces te gronde

---

1) Americ. Journal of Phyisol. **17**, 273; 1906.
2) Deutsche Mediz. Wochenschr. 499; 1904.

was gegaan, nemen zij aan, dat deze stof opgevat moet worden als retentieproduct, daar de nieren, welke een parenchymateuse degeneratie vertoonden, niet meer in staat zouden zijn, de overtollige aminozuren af te scheiden.

NEUBERG en STRAUSS 1), waarvan de laatste aantoonde het groote belang van de R. N. bij verschillende nieraandoeningen en tevens had aangetoond de rol, die de bestanddeelen van die R. N.: ureum, urinezuur en ammoniak, onder die omstandigheden spelen, besloten nu ook het gehalte aan aminozuren in het bloed onder dergelijke pathologische omstandigheden na te gaan. Zij gebruikten hiervoor een methode, beschreven door NEUBERG en MANASSE, welke er op berust, dat aminozuren, geschud met α-naphtyl-isocyanaat in alcalisch milieu verbindingen aangaan, welke gemakkelijk zijn te herkennen. Daar deze methode volgens NEUBERG ook de hoeveelheid aminozuren kan leeren kennen, kan dus het aminozuur-gehalte van het bloed bepaald worden. De waarden, die schrijvers opgeven, gelden voor verbindingen van het aminozuur met α-naphtyl-isocyanaat. Zoo vinden zij dan, dat het bloed van een patiënt, tijdens coma-diabeticum, evenals dat van een patiënt, lijdende aan nephritis, tengevolge van chronische lood-intoxicatie 5 $^0/_{00}$ aminozuur bevat. Bij de chronische parenchymateuse nephritis was dit bedrag 0.5 $^0/_{00}$, terwijl bij een overgangsvorm tusschen een chronische parenchymateuse en chronische interstitieele nephritis 0.81 $^0/_{00}$ gevonden werd. Schrijvers meenen, uit hun onderzoekingen te mogen besluiten, dat bij de chronische interstitieele nephritis er een verhooging van het aminozuur-gehalte in het bloed is, terwijl bij de chronische parenchymateuse vormen geen, of slechts een geringe vermeerdering bestaat. Zij vatten deze verhooging op als een retentieverschijnsel; de zieke nier zou niet meer in staat zijn,

1) Berlin. klinische Wochenschr., 43^I, 258; 1906.

de aminozuren met de urine te verwijderen. Zij trachten dit te staven, door bij een konijn beide nieren weg te nemen, waardoor na 64 uur het aminozuur-gehalte van uiterst weinig, tot 2.4 $^0/_{00}$ steeg.

Wezen dus al deze onderzoekingen in de richting, dat aminozuren in het bloed aanwezig zijn, zonder dat het gelukte, wegens onvoldoende methodiek, dit voor normale omstandighden vast te stellen, toch hebben verschillende schrijvers getracht aan te toonen, het groote belang van deze stoffen voor de stofwisseling, waarbij de leidende gedachtengang deze was, dat wanneer aminozuren door het bloed van uit den darm worden opgenomen en voor de stofwisseling van belang zijn, deze stoffen op andere wijze dan door den darm toegevoerd, eveneens door het organisme geassimileerd zouden worden, terwijl het eveneens mogelijk moest zijn het organisme in stand te houden, door het te voeden met splitsingsproducten van eiwitstoffen, in casu aminozuren.

Zoo voedde O. Loewi 1) honden gedurende langen tijd met door middel van pancreassap gedigereerd vleesch (dus met een mengsel van vèrgesplitste eiwitstoffen, waarbij bleek, dat het mogelijk was deze dieren in stikstofevenwicht te houden, waaruit volgt, dat dit ver gesplitste eiwit den darmwand gepasseerd moet zijn en door de weefsels geassimileerd wordt. Tot dezelfde resultaten kwamen Henderson en Dean 2) en ook de onderzoekingen van Abderhalden 3) wezen in dezelfde richting. Niet alleen vermocht Abderhalden honden in stikstofevenwicht te houden door voedering met totaal gedigereerd vleesch, maar zag zelfs deze dieren hiermee in gewicht toenemen. Ook bracht hij 4) in de afgesloten

---

1) Centralbl. für Physiolog. **16**, 590; 1902.
2) Americ. Journ. of Physiol. **9**, 386; 1903.
3) Zeitschr. für physiolog. Chem. **42**, 528; 1904.
4) Zeitschr. für physiolog. Chem. **53**, 113; 1907.

maag van een hond 8 gr. alanine, schakelde de leverwerking bijna geheel uit door het aanleggen van een fistel van Eck en doodde na eenigen tijd het dier. Al het bloed werd nu zooveel mogelijk verzameld en met behulp van β-naphtalinesulfochloride op alanine onderzocht. Men kon toen in totaal 0.5 gr. alanine in het bloed vinden, terwijl in de tijdens de proef afgescheiden urine eveneens 0.5 gr. alanine was aan te toonen en in de maag geen spoor dezer stof was overgebleven. De conclusie ligt dus voor de hand, dat het grootste deel van de alanine door de weefsels is opgenomen. Tenslotte werden nog proeven genomen door alanine direct in de bloedbaan te spuiten, waarbij ook weer bleek, dat een klein gedeelte na eenigen tijd in het bloed was terug te vinden, de urine een weinig alanine bevatte, maar dat het grootste deel uit de circulatie verdwenen en waarschijnlijk door de weefsels opgenomen was.

V. Henriques en Hansen 1) deden een aantal proeven met ratten, welke zij met de afbraakproducten van caseïne voerden. Deze producten werden verkregen door caseïne bloot te stellen gedurende eenigen tijd aan de werking van trypsine en erepsine en door haar te koken met minerale zuren.

Uit hun proeven blijkt nu, dat ratten, gevoed met caseïne en met door enzymwerking gesplitste caseïne, in stikstofevenwicht bleven en de stikstofbalans zelfs positief werd, terwijl de dieren gevoed met door minerale zuren gehydrolyseerde caseïne niet in stikstofevenwicht waren te houden, de stikstofbalans negatief werd en zij snel te gronde gingen.

Uit deze proeven blijkt dus weer, dat ratten eenigen tijd in leven zijn te houden met de laagste splitsingsproducten van eiwit, dat zij zelfs, hiermee gevoed, in gewicht toenemen, maar tevens blijkt, dat de door enzymwerking gesplitste

1) ibid. **43**, 417; 1905. **49**, 113; 1906. **54**, 406; 1907.

caseïne andere eigenschappen heeft dan de met minerale zuren gehydrolyseerde. Of in het laatste geval vergiftige nevenproducten ontstaan, dan wel door het koken met sterke zuren aminozuren ontleed zijn, welke zooals later MENDEL, OSBORNE 1) e.a. hebben aangetoond, voor het leven onontbeerlijk zijn, zou ik niet durven uitmaken.

V. HENRIQUES en ANDERSEN 2) brachten bij geiten en honden gedurende langen tijd (éénmaal zelfs 20 dagen lang) verschillende voedingsstoffen, waaronder ook gedigereerd vleesch, dat nog voor ongeveer 15 percent peptiden bevatte, onmiddellijk in de bloedbaan, door in de vena jugularis of lienalis een glascanule te bevestigen. De urine werd nu onderzocht op het totale stikstofgehalte, waarbij bepaald werd, hoeveel percent hiervan op de stikstof van ureum, aminozuren en ammoniak kwam. Hierbij bleek, dat stikstof in het lichaam werd afgezet en dat het aminozuur-gehalte der urine meestal een weinig, maar niet steeds, verhoogd was, terwijl het ureum-gehalte steeds toenam, wat verklaard wordt door aan te nemen, dat de aminozuren dit ureum hebben geleverd. Verder bleek, dat het grootste deel van de peptiden met de urine werd afgescheiden.

Uit bovenstaande is dus de conclusie te trekken, dat aminozuren onmiddellijk in de bloedbaan gebracht, geassimileerd kunnen worden en slechts voor een klein deel door de urine worden afgescheiden, terwijl de meer samengestelde splitsingsproducten bijna geheel door de urine worden verwijderd, zoodat ook deze proeven weer sterk in de richting wijzen, dat van uit den darm de laagste splitsingsproducten van het eiwit geresorbeerd worden.

De eerste, wien het tenslotte gelukte om in normaal bloed aminozuren aan te toonen, was A. BINGEL. 3)

---

1) Zie UNDERHILL: The Physiol. of the amino-acids 136; 1915.
2) Zeitschr. für physiolog. Chem. **88**, 357; 1913.
3) Zeitschr. für physiolog. Chem. **57**, 382; 1908.

Hij ging uit van 10 L. paardenbloed, dat door middel van een sublimaat-oplossing, welke 2 percent zoutzuur bevatte, van eiwit bevrijd werd. Na toevoeging van deze oplossing werd gefiltreerd en in het filtraat het aanwezige kwik door ammoniumsulfide neergeslagen, wederom gefiltreerd en in het aldus verkregen filtraat het ammoniumsulfide door een luchtstroom verdreven. Daarna werd, om omzetting van aminozuren zooveel mogelijk tegen te gaan, bij neutrale reactie en bij verminderden druk ingedampt. De aldus geconcentreerde vloeistof werd nu geschud gedurende 9 uur bij alcalische reactie met β-naphtaline-sulfochloride. Uit het daarvoor verkregen praecipitaat kon BINGEL nu het zuivere β-naphtaline-sulfo-glycocoll afscheiden. Uitgaande van 10 L. paardenbloed werd 0.21 gr. van deze stof gewonnen.

Hiermede was dus de aanwezigheid van glycocoll in paardenbloed aangetoond. Deze methode echter geeft zeker te lage uitkomsten, daar bij het omkristalliseeren, ter verkrijging der chemisch zuivere verbindingen, veel verloren gaat.

Eerst twee jaren later verscheen eene mededeeling over bepalingen van het gehalte aan aminozuren in bloed; gebrek aan een goede methode was wel de oorzaak, dat deze zoo lang op zich liet wachten.

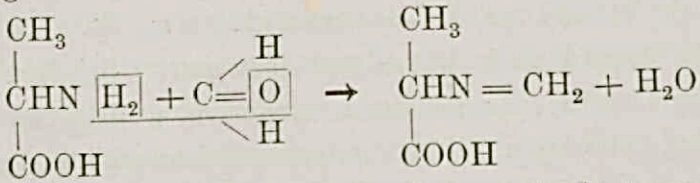
Wel had SÖRENSEN in 1907 reeds een methode gepubliceerd om zeer nauwkeurig aminozuren te bepalen en was deze methode al gebruikt door V. HENRIQUES 1) om het aminozuurgehalte der urine vast te stellen, maar voor het bloed was deze methode nog niet uitgewerkt.

Deze methode berust op het feit, dat aminozuren met formol een verbinding aangaan, waardoor de amino-groep, welke basische eigenschappen heeft, deze verliest en de eigenschappen der carboxyl-groepen ongehinderd tevoorschijn komen.

Door nu de hoeveelheid vrijgekomen zuur te titreeren kan

1) Zeitschr. für physiolog. Chem. **60**, 1; 1909.

men besluiten, hoeveel aminozuur aanwezig is. De reactie is als volgt:



DELAUNAY 1) was degene, die deze methode toepaste ter bepaling van het aminozuur-gehalte van het bloed onder verschillende omstandigheden. Zoo vond hij bij een hond 4 uur na een eiwitrijken maaltijd, dat het amino-stikstof-gehalte van het portale bloed bedroeg 21.4 mgr. op 100 cc. bloed, van het arteriëele 9.9 mgr. en van het bloed uit de vena cava 5.5 mgr. Voorts bleek, dat na een eiwitrijken maaltijd het aminozuur-gehalte van het perifere bloed slechts weinig verhoogd was, maar dat in het bloed der vena portae wel een belangrijke vermeerdering dezer stoffen kon vastgesteld worden. DELAUNAY besluit zijn gegevens, dat het eiwit, in den darm afgebroken tot aminozuren, in dezen vorm wordt geresorbeerd, dat de lever in staat is het te veel aan aminozuren te desamideeren en uit het afgesplitste ammoniak ureum te vormen en dat de weefsels, gezien het verschil in aminozuurgehalte tusschen het arteriëele en het veneuse bloed, in staat zijn aminozuren uit het bloed op te nemen. Dat de lever in staat is aminozuren te desamideeren, bewees SALASKIN 2), die door de lever van hongerende honden gedefibrineerd bloed met aminozuren leidde en zag, dat deze verdwenen, terwijl het ureum-gehalte van het uitstroomende bloed verhoogd bleek te zijn.

Ook de verschillende weefsels der dieren bevatten aminozuren. Zoo vond hij in het spierweefsel van den hond

1) Contribution à l'étude du rôle des acides-aminés dans l'organisme animal. Thèse de Bordeaux 1910.

2) Zeitschr. für physiolog. chem. **25**, 128; 1898.

168—255 mgr. amino-stikstof op 100 gr. en in de lever 168—210 mgr.

Ten slotte werd nog nagegaan het aminozuur-gehalte van bloed en weefsels van eenige invertebraten (Cephalopoden). Het bleek, dat bloed en weefsel dezer dieren veel meer aminozuren bevatte dan dat der vertebraten, maar dat geen of bijna geen glucose daarin was aan te toonen. DELAUNAY vat de aminozuren op als te zijn intermediaire stofwisselingsproducten en kent aan hen dezelfde rol toe, die de glucose heeft voor de koolhydraat-stofwisseling: „un corps intermédiaire, qui naît et meurt dans l'organisme sans parvenir aux voies d'excrétion''. Bij de Cephalopoden zouden de aminozuren dan de plaats der glucose innemen. Aangaande de door de weefsels opgenomen aminozuren stelt DELAUNAY zich voor, dat zij daar of verbrand worden en zoodoende evenals de glucose een bron van energie vormen, of dienen tot vorming van nieuw weefsel.

Eenige jaren nadat DELAUNAY zijn onderzoekingen over het aminozuur-gehalte van het bloed gepubliceerd had, verscheen het werk van een Amerikaan, D. D. VAN SLYKE 1), waarin een geheel nieuwe methode werd aangegeven ter bepaling van aminozuren.

Uitgaande van het feit, dat aminozuren behandeld met salpeterigzuur hun stikstof afgeven volgens de vergelijking:

$$R-\underset{\underset{COOH}{|}}{CHNH_2} + HNO_2 \rightarrow R-\underset{\underset{COOH}{|}}{CHOH} + H_2O + N_2$$

waarbij dus de helft van de ontwikkelde stikstof afkomstig is van aminozuren en de andere helft van het salpeterigzuur, heeft v. SLYKE een methode uitgewerkt, waarbij het mogelijk is, deze stikstof zeer nauwkeurig te meten, zoodat men hiermee het amino-stikstof-gehalte kan bepalen.

---

1) Journ. of Biol. Chem. **9**, 185; 1911.

Met deze methode bepaalde v. SLYKE nu, in samenwerking met G. M. MEYER 1), het amino-stikstof-gehalte van het bloed. Hiertoe werd het bloed behandeld met absoluten alcohol waardoor het eiwit neerslaat en werd na eenigen tijd gefiltreerd. Het filtraat werd ingedampt en vervolgens direct voor een bepaling gebruikt. Zij deden proeven met honden vóór en nà een eiwitrijken maaltijd. Zoo bleek, nadat de hond 24 uur gevast had, dat het amino-stikstof-gehalte van het arteriëele bloed was 3.7—4.4 mgr. op 100 cc. bloed, van de vena cava 5.4 mgr. en van de v. mesenterica 3.9 mgr., terwijl na vleeschvoeding in het bloed der arteria femoralis 8.6 mgr. en in dat van de vena mesenterica 10.2 mgr. amino-stikstof werd gevonden. Ook na inspuiting van alanine in den darm kon een verhooging van het amino-stikstof-gehalte in de v. mesenterica worden daargenomen en wel van 3.9 mgr. nuchter tot 6.3 mgr. na de inspuiting.

Na dus vastgesteld te hebben, dat aminozuren door den darm als zoodanig geresorbeerd worden, werd nagegaan wat er met deze stoffen verder in het organisme geschiedt.

Daartoe werd een aantal bepalingen gedaan van het aminozuur-gehalte van bloed en weefsels, waaruit zij het besluit trokken, dat: „The amino-acids are merely absorbed from the blood by the tissues, without undergoing any immediate chemical change."

Tevens bleek uit deze proeven, dat het vermogen der weefsels om aminozuren uit het bloed op te nemen, beperkt is. Bevat het spierweefsel b.v. 76 mgr. amino-stikstof op 100 gr. weefsel, dan heeft geen verdere absorptie plaats. De capaciteit der inwendige organen zooals nieren, lever enz. is grooter. Zoo is de lever eerst verzadigd als zij 125—150 mgr. op 100 gr. weefsel bevat. Nooit echter zijn de weefsels in staat om al de aminozuren uit het bloed op te nemen; steeds bevatte het

1) Journ. of Biol. Chem. **12**, 399; 1912.

bloed als minimum 3.8 mgr. amino-stikstof op 100 cc. bloed.

Nadat dus vastgesteld was, dat weefsel en bloed aminozuren bevatten en dat de weefsels in staat zijn aminozuren aan de circulatie te onttrekken, werd nog nagegaan hoe de verschillende weefsels zich tegenover deze opgenomen aminozuren gedragen. Hiertoe werden honden gedurende langen tijd uitsluitend gevoed met stikstofvrije kost, waarna een groote, maar niet vergiftige dosis (0.15—0.20 gr. per K. G. lichaamsgewicht) glycocoll in de bloedbaan werd gespoten.

Het bleek nu, dat alle weefsels glycocoll opnamen, dat 3 uur na de inspuiting het aminozuur-gehalte van de spieren niet verminderd was, dat kort na de injectie dit gehalte van de lever veel hooger was dan dat der spieren, maar dat na 3 uur in de lever geen spoor van de ingespoten glycocoll meer was terug te vinden, terwijl het ureum-gehalte van het bloed verhoogd was en in de urine iets meer aminozuur voorkwam dan normaal, echter niet zooveel als uit de lever verdwenen moest zijn. VAN SLYKE besluit dan ook uit deze uitkomsten, dat de ingespoten glycocoll, voor zoover niet door de weefsels geabsorbeerd en vastgehouden, in de lever gedesamideerd wordt, waarbij dan ureum ontstaat. De proeven van VAN SLYKE stemmen dus nagenoeg volkomen overeen met die van DELAUNAY en ook hun besluiten zijn eensluidend.

Het verschil in volstrekte waarden der uitkomsten tusschen beide onderzoekers is waarschijnlijk gelegen in de verschillende manier, welke zij aanwenden om het bloed van eiwit te bevrijden. De lage waarden, welke VAN SLYKE vindt, moeten zeker toegeschreven worden aan het gebruik van absoluten alcohol, waardoor een gedeelte der aminozuren met het eiwit neergeslagen wordt, zooals FOLIN en DENIS 1) en later GREENWALD 2) aantoonden.

---

1) Journ. of Biol. Chem. **11**, 527; 1912.

2) ibid. **21**, 61; 1915.

Staat dus het aminozuur-gehalte van het bloed in verband met de eiwitdigestie en resorptie in den darm, een tweede vraag was, of alle aminozuren, in het bloed aanwezig, uitsluitend afkomstig zijn van het voedsel. De mogelijkheid is toch niet uitgesloten, daar de weefselcellen proteolytische enzymen bevatten, dat bij de splitsing van eiwitachtige stoffen in die weefsels aminozuren vrijkomen, welke als producten der weefselstofwisseling zijn op te vatten.

Om een antwoord op deze vraag te geven, schakelde VAN SLYKE één bron, welke aminozuren kan leveren, uit, door de beesten te laten hongeren, waardoor dus van uit den darm geen aminozuren kunnen worden opgenomen en ging na, hoe of het aminozuur-gehalte van het bloed en de weefsels veranderde. 't Bleek nu, dat in geen geval door honger de aminozuren uit het bloed en weefsels verdwenen en dat het gehalte ervan eerder verhoogd dan verminderd was.

Daar tijdens honger zeker afbraak van eiwit in de weefsels plaats heeft, zien v. SLYKE en MEYER in de aminozuren ook intermediaire stofwisselingsproducten, ontstaan door afbraak van eiwit van het organisme zelf.

Volgens v. SLYKE hebben de aminozuren van het bloed dus een dubbele beteekenis: een gedeelte, afkomstig van het voedsel, dient om aan de weefsels afgegeven te worden, die het òf als bron van arbeidsvermogen gebruiken òf het gebruiken om nieuw weefsel te vormen; een ander gedeelte is afkomstig uit de weefsels, daar ontstaan door afbraak van eiwit, hetwelk of in de lever omgezet tot ureum of met de urine afgescheiden wordt. Is de lever door pathologische veranderingen niet meer in staat deze aminozuren te desamideeren en om te zetten in ureum, dan worden zij met de urine afgescheiden.

Ook FOLIN en DENIS 1) hebben zich moeite gegeven, de rol, die de aminozuren bij de eiwitresorptie spelen, na te gaan.

1) Journ. of Biol. Chem. **11**, 87; 1912.

Gebruikten DELAUNAY en v. SLYKE een directe methode ter bepaling van het amino-stikstof-gehalte van bloed en weefsels, FOLIN en DENIS vonden deze waarden door van de totale R. N. de ureum-stikstof af te trekken. 't Is duidelijk, dat deze methode niet zoo nauwkeurig is als de beide anderen, daar met de amino-stikstof tevens ook de stikstofhoudende bestanddeelen van het bloed, welke geen ureum zijn, bepaald worden en dus het amino-stikstof-gehalte te hoog wordt gevonden. (Zoo vindt FOLIN in het veneuse bloed van de kat 12 mgr. en BOCK, met de methode van v. SLYKE, 8.68 mgr. amino-stikstof op 100 cc. bloed). Volgens FOLIN en DENIS zou de volstrekte fout niet groot zijn, daar de stikstofhoudende stoffen, welke de R. N. leveren en noch ureum, noch aminozuren zijn, in geringe hoeveelheid voorkomen in het bloed.

De proeven aldus genomen toonden aan, dat wanneer glycocoll in den darm van de kat werd gebracht, het amino-stikstof-gehalte van het bloed der vena portae steeg. Was dit gehalte nuchter 12 mgr. op 100 cc. bloed, 6 minuten na het inbrengen van de glycocoll steeg dit cijfer tot 16, na 18 minuten tot 33 en na 45 minuten tot 64 mgr., terwijl deze getallen waren voor bloed uit de carotis resp. 15, 25 en 36 mgr. en het gehalte aan amino-stikstof der spieren, dat vóór de proef 223 mgr. op 100 gr. spier bedroeg, 45 minuten na de glycocoll-voeding steeg tot 319 mgr. Proeven genomen met gedigereerd eiwit wezen in dezelfde richting en ook na vleeschvoeding steeg het amino-stikstof-gehalte van het bloed der vena portae van 14 mgr. tot 22 mgr. en van het bloed uit de carotis van 12 mgr. tot 22 mgr.

Daar zij door vorige onderzoekingen tot het besluit waren gekomen, dat de lever niet in staat is aminozuren te desamideeren, besluiten zij, dat het bloed alleen transportmiddel is voor de aminozuren van den darm naar de weefsels. Niet geheel juist lijkt mij dit besluit, in de eerste plaats hierom,

omdat niet aangetoond is, dat aminozuren tijdens honger verdwijnen en in de tweede plaats begrijp ik niet hoe FOLIN en DENIS dan het feit verklaren, dat na inspuiting van glycocoll in den darm het aminozuur-gehalte van het bloed uit de vena portae zooveel hooger is dan dat van de arteria carotidea. Hieruit toch zou volgen, dat een gedeelte der aminozuren verdwenen is en daar het eenige orgaan, dat het bloed doorstroomt alvorens in de carotis te komen, de lever is, afgezien van het hart, is 't toch wel zeer waarschijnlijk, dat deze aminozuren in de lever zijn vastgehouden en dat de stikstof ervan is omgezet in ureum, hetwelk na vleeschvoeding in verhoogde mate door de nieren wordt afgescheiden.

In aansluiting aan deze proeven van FOLIN en DENIS wil ik hier vermelden de onderzoekingen van BANG 1) over het amino-stikstof-gehalte van het bloed. Ook BANG bepaalde dit gehalte door van de totale R. N., de ureum-stikstof af te trekken. In zeer kleine hoeveelheden bloed (plm. 200 mgr.) werd aldus de amino-stikstof-fractie bepaald. Onderzoekingen werden gedaan zoowel in het bloedplasma, als in de bloedlichaampjes en BANG kwam tot het besluit, dat zoowel het plasma als de lichaampjes aminozuren bevatten en wel het plasma iets meer dan de lichaampjes.

Daar BANG door onderzoekingen over de permeabiliteit van bloedlichaampjes tot het besluit is gekomen, dat deze niet doorgankelijk zijn voor deze stoffen, geeft hij twee verklaringen: òf het is mogelijk, dat aminozuren actief van uit het plasma worden opgenomen, òf ze ontstaan in de bloedlichaampjes zelf. 't Laatste lijkt BANG het waarschijnlijkste, omdat deze cellen proteolytische enzymen bevatten, welke dus intracellulair eiwit kunnen afbreken. Verder denkt BANG zich nu, dat de cellen actief deze aminozuren afstaan aan het plasma,

1) Bioch. Zeitschr. **72**, 1916.

zoodat hij nog niet overtuigd is, dat de aminozuren, welke men in het plasma aantreft, uit den darm afkomstig zijn.

Steun aan deze opvatting gaf het onderzoek tijdens honger, waarbij het aminozuur-gehalte van het plasma constant bleef, terwijl ook na eiwitvoeding geen vermeerdering der aminozuren in het perifere bloed werd waargenomen, soms zelfs eene vermindering. Aan den anderen kant zou ik er op willen wijzen, dat bijna alle onderzoekers hebben gevonden, dat het aminozuur-gehalte van het bloed na eiwitvoeding verhoogd is en wel vnl. van het bloed uit de poortader, zoodat toch wel als vaststaand mag worden aangenomen, dat een gedeelte der aminozuren van het bloed afkomstig is van met het voedsel opgenomen eiwit. Dat echter de verschillende cellen in staat zouden zijn, aminozuren als intracellulaire afbraakproducten aan het bloed af te geven, daarop heeft v. Slyke reeds gewezen, terwijl Constantino een verhooging van het amino-stikstof-gehalte der weefsels tijdens honger meende te kunnen aantoonen.

Als gemiddelde voor het amino-stikstof-gehalte van den mensch geeft Bang op 12 mgr. op 100 cc. bloed, voor het rund eveneens 12 mgr. en voor het konijn 17 mgr. Voedde hij een konijn met aminozuren, dan bleek het gehalte aan deze stoffen van het perifere bloed verhoogd te zijn, terwijl door de urine aminozuren werden afgescheiden en het ureum-gehalte van de urine verhoogd was. Aminozuren onmiddellijk in de bloedbaan gebracht, werden voor een gedeelte door de nieren afgescheiden, terwijl het ureum-gehalte der urine eveneens verhoogd was. Een berekening leerde echter, dat een gedeelte der aminozuren zoo niet was terug te vinden, zoodat Bang aanneemt, dat deze door de weefsels zijn opgenomen. Ten slotte werd het aminozuur-gehalte van het bloed nog nagegaan onder pathologische omstandigheden. Een konijn, dat door inspuiting met sublimaat een nephritis had gekregen, vertoonde geen verhooging van dit gehalte, terwijl een dier met phosphorus

ingespoten, waardoor een zware leveratrophie werd veroorzaakt, reeds na 2 dagen een verhooging van het aminozuurgehalte van het bloed van 40 percent aanwees.

Ook DOBROWOLSKAJA 1) bestudeerde de aminozuur-resorptie van uit den darm, daarbij zoowel de methode van SÖRENSEN als die van v. SLYKE gebruikend. Hij legde daartoe bij een hond een darm- en een poortader-fistel aan, waardoor op elk gewenscht oogenblik bloed verkregen kon worden. Het bleek nu, dat tijdens digestie het poortaderbloed meer aminozuren bevatte dan het perifere bloed; er is echter geen regelmatig toenemen der aminozuur-waarde, maar dit gaat schoksgewijs. Korten tijd nadat 't vleesch in den darm was gebracht, vond hij een verhooging van het getal, dat de verhouding aangeeft tusschen amino-stikstof en totale R. N., terwijl na 4 uur digestie dit getal verlaagd zou zijn, soms ook verhoogd. DOBROWOLSKAJA denkt zich nu een reguleerende werking van den darmwand, waardoor verhinderd wordt, dat het bloed met aminozuren overstroomd wordt. Hebben de weefsels de toegevoerde aminozuren opgenomen, dan kan weer een nieuwe hoeveelheid van uit den darm in het bloed overgaan.

Gezien de uitkomsten van v. SLYKE en anderen, welke een groote hoeveelheid glycocoll onmiddellijk in de bloedbaan spoten, die snel door de weefsels opgenomen, door de lever gedesamideerd of met de urine afgescheiden werd, lijkt mij de theorie van DOBROWOLSKAJA niet zeer waarschijnlijk, daar het lichaam toch zeer goed in staat is, om groote hoeveelheden aminozuren snel te verwerken, zoodat de kleine hoeveelheid van deze stoffen, die in den darm geleidelijk tijdens digestie ontstaat en welke geleidelijk geresorbeerd wordt, wel geen reguleerende werking behoeft om te verhoeden, dat het

---

1) Bioch. Zeitschr. **56**, 267; 1913.

organisme met aminozuren van uit den darm overstroomd wordt.

CONSTANTINO 1) heeft zich bezig gehouden met de studie der verdeeling van de aminozuren tusschen plasma en bloedlichaampjes. Hij vindt dan zoowel in het plasma als in de lichaampjes amino-stikstof, terwijl de laatsten, in tegenstelling met wat BANG vond, betrekkelijk meer aminozuren bevatten dan het eerste en de witte bloedlichaampjes twee maal zooveel van deze stoffen bevatten als de roode. Verder bleek, dat na eiwitvoeding het aminozuur-gehalte van het plasma niet, dat der bloedlichaampjes wel verhoogd was. Tijdens honger is de verdeeling als volgt: 45.8 percent in het plasma en 54.16 percent in de lichaampjes, terwijl na voeding met eiwit deze getallen zijn resp. 35.15 en 64.37 percent. Verder vond CONSTANTINO niet veel verschil in het aminozuur-gehalte van het arteriëele en het veneuse bloed, terwijl de lymphe een spoor dezer stoffen scheen te bevatten.

PAUL GYÖRGY en EDG. ZUNZ 2) bepaalden eveneens het gehalte aan aminozuren van bloedlichaampjes en plasma en komen tot dezelfde uitkomsten als CONSTANTINO. Verder bleek ook weer bij deze proeven, dat het aminozuur-gehalte van het bloed na vleeschvoeding verhoogd is en dat tijdens honger dit gehalte bij den hond vrijwel standvastig blijft, schommelende tusschen 4 en 5 mgr. op 100 cc. bloed. Werd een hond veel bloed ontnomen, dan nam men een verhooging waar.

Ook BOCK 3), die een groot aantal bepalingen van het aminozuur-gehalte van het bloed verricht heeft, bestudeerde de verdeeling ervan tusschen plasma en bloedlichaampjes. Bij het

---

1) Bioch. Zeitschr. **51**, 91; 1913.
2) Journ. of Biol. Chem. **21**, 509; 1915.
3) ibid. **29**, 191; 1917.

rund vond hij, dat deze stoffen gelijkelijk over lichaampjes en plasma verdeeld zijn, terwijl bij vogels de lichaampjes twee maal zooveel bevatten als het plasma. Na een aanzienlijk bloedverlies vond Bock evenals bovengenoemde schrijvers, dat het aminozuur-gehalte belangrijk verhoogd was. Tenslotte bleek uit een aantal bepalingen, dat er wel verschillen bestaan in de gehalten van het bloed van verschillende soorten van dieren aan amino-stikstof, maar dat bij een bepaalde diersoort dit gehalte vrijwel standvastig genoemd kan worden. Zoo vond hij voor het rund 6.58 mgr. amino-stikstof op 100 cc. bloed, voor het schaap 7.63 mgr., voor het varken 8.43 mgr., voor de kat 8.68 mgr., voor den hond 7.47 mgr., voor het kuiken 20.99 mgr., voor de eend 21.32 mgr. en voor den mensch 7.13 mgr. terwijl in het placentaire bloed van den mensch 9.48 mgr. werd gevonden.

In den allerlaatsten tijd hebben Falta en M. Richter 1) zich bezig gehouden met de vraag hoe of verschillende stoffen zooals glucosen, chloriden en rest-stikstof-bestanddeelen zich in het bloed bevinden; of zij, zooals door velen aangenomen wordt, zoowel in het plasma als in de lichaampjes voorkomen, dan wel of 't vinden dezer stoffen in de lichaampjes een gevolg is van veranderingen in de uiterste laag van deze lichaampjes, ontstaan door de behandeling om ze geïsoleerd van het plasma te verkrijgen, waardoor tijdens het scheidingsproces deze stoffen in de lichaampjes dringen.

Falta en Richter gelooven nu, dat onder normale omstandigheden noch glucose, noch chloriden, noch R. N.-bestanddeelen in opgelosten toestand in de normale bloedlichaampjes voorkomen, maar dat zij daarin hoogstens in colloïdalen toestand aanwezig zijn. Als voorbeeld halen zij aan, hoe glucose òf direct in de cel verbrandt, òf als glycogeen bewaard wordt.

---

1) Bioch. Zeitschr. **100**, 148; 1919.

Zij wijten dan ook de uitkomsten der vorige onderzoekers, die deze stoffen wel in bloedlichaampjes vonden, aan een verkeerde methodiek, daar natriumoxalaat en fluornatrium meestal gebruikt om de stolling tegen te gaan, vooral indien lang gewacht wordt met centrifugeeren, als vergif werken, waardoor de uiterste laag dusdanig verandert, dat zij permeabel wordt voor in het plasma opgeloste stoffen.

Schrijvers zien nu in hirudine een stof, welke de stolling van het bloed verhindert zonder de bloedlichaampjes aan te tasten.

Om hun stelling te bewijzen, redeneeren zij als volgt: Wanneer glucose, enz. zich niet in de cellen bevinden, dus de totale hoeveelheid dezer stoffen in het plasma moet aanwezig zijn, laat zich uit het gehalte van het bloed en het plasma aan deze stoffen, het volumen der bloedlichaampjes berekenen. Als voorbeeld geven zij het volgende:

100 cc. totaal bloed bevat 360 mgr. **vrij** Cl.
100 cc. plasma bevat 600 mgr. **vrij** Cl.

waaruit dan volgt, wanneer x het volumen van het plasma van 100 cc. totaal bloed voorstelt, dat in x cc. plasma voorkomen 360 mgr. Cl. Wij weten, dat in 100 cc. plasma voorkomen 600 mgr. Cl., waaruit volgt dat $x = \frac{360}{600} \times 100 = 66$ cc. Het volumen van de bloedlichaampjes moet dus zijn $100 - 60 = 44$ cc.

Dat het op deze wijze werkelijk mogelijk is, het volumen der bloedlichaampjes te bepalen, bewijzen zij door talrijke proeven, waarbij als controle dient het volumen der bloedlichaampjes verkregen met den haematocryt.

Uit hun onderzoekingen blijkt nu, dat de stoffen, welke de totale R.N. leveren (waaronder dus de aminozuren) uitsluitend of bijna uitsluitend in het plasma voorkomen. Zij besluiten dan ook: „Es findet sich also, unter physiologischen Verhältnissen sowohl nüchtern wie bei Erhöhung des Rest-Stick-

stoffes nach dem Genusz einer Eiweiszreichen Nährung, der Rest-Stickstoff ausschlieszlich oder nahezu ausschlieszlich im Plasma und selbst unter gewissen pathologischen Verhältnissen mit sehr bedeutender Vermehrung des Rest-Stickstoffes können die Blutkörperchen frei von Rest-Stickstoff bleiben, doch möchten wir betonen, dasz dies unter pathologischen Verhältnissen durchaus nicht immer der Fall ist''. Zoo vinden zij b.v. bij een patient met zware nephritis, dat de helft der R. N. in de lichaampjes aanwezig is.

Tegenover de positieve uitkomsten der vorige onderzoekers, welke allen aantoonden het voorkomen van aminozuren in het normale bloed, staan ook eenige negatieve uitkomsten, waarbij het niet gelukte, om in het van eiwit bevrijde bloed aminozuren te vinden

M. Labbé en H. Bith 1) en ook H. Labbé en R. Dabré 2) vermochten met de methode von Sörensen geen amino-stikstof aan te toonen, wanneer zij op de gewone wijze eerst het bloed van eiwit bevrijdden. Daarom deden zij bepalingen in het niet van eiwit bevrijde plasma en vonden dan steeds een positieve uitkomst, welke zij echter toeschreven aan een binding van formol met vrije amino-groepen der eiwitstoffen.

Behalve deze onderzoekingen over het aminozuur-gehalte in normaal bloed, werden ook onderzoekingen gedaan onder verschillende pathologische omstandigheden. Zoo vonden M. Gorchkoff en W. Grigórieff 3) een verhooging bij leverziekten, ziekten van den tractus intestinalis, stofwisselingsziekten, infectieziekten en bloedziekten. Bij een patient met gastro-enteritis was het gehalte nuchter 20 mgr. en na vleeschvoeding 17—44 mgr. op 100 cc. bloed. Alecs Oscaki vond een verhooging bij nierziekten en ook Bock 4)

---

1) Comptes Rendues Hebd. Sociét. de Biologie **75**, 398; 1913.
2) ibid. **74**, 289; 1913. 3) ibid. **76**, 454; 1914.
4) Journ. of Biol. Chem. **29**, 191; 1917.

vond een sterke verhooging tijdens uraemie en bij levercirrhose.

Ten slotte bepaalde RABINOWITCH[1]) nog het aminozuur-gehalte van het placentaire bloed. Zoo vond hij in de arteria umbilicalis 37 mgr. en in de vena umbilicalis niet minder dan 110—117 mgr. van deze stoffen in 100 cc. bloed, terwijl in het veneuse bloed van de niet zwangere vrouw dit gehalte schommelde tusschen 8 en 11 mgr.

Behalve deze onderzoekingen naar het gehalte aan aminozuren in het bloed hebben eenige onderzoekers zich ook moeite gegeven om deze stoffen nader te leeren kennen. Door enorme hoeveelheden bloed te dyaliseeren kon ABDERHALDEN[2]) de volgende aantoonen: glycocoll, alanine, arginine, histidine, lysine, proline, leucine, valine, asparaginezuur en glutaminezuur.

Samenvattend kunnen wij dus uit de verschillende, bovengenoemde onderzoekingen besluiten:

1°. Dat de eiwitstoffen van het voedsel in het spijsverteringskanaal nagenoeg geheel gesplitst worden in aminozuren en dat het deze zijn, die tot resorptie komen, terwijl de resorptie van albumosen en peptonen onder normale omstandigheden nauwelijks in aanmerking komt;

2°. Dat dus verwacht kan worden dat bloed, weefselvocht en urine, aminozuren bevatten;

3°. Dat dan ook ten slotte de aanwezigheid van aminozuren in deze vochten met zekerheid is aangetoond;

4°. Dat aminozuren in meetbare hoeveelheid hierin aanwezig zijn, hoewel het gehalte wisselend is;

5°. Dat dit laatste samenhangt, zooals te verwachten was, met de voeding en wel in dien zin, dat na eiwitvoeding het gehalte meestal verhoogd is;

---

[1]) Comptes Rendues Hebd. Sociét. de Biologie **76**, 457; 1914.

[2]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **88**, 478; 1913.

6°. Dat na eiwitvoeding het gehalte aan aminozuren van het portale bloed, grooter is, dan dat van het perifere, zoodat de lever in staat moet zijn, aminozuren tegen te houden, waarbij zij waarschijnlijk gedesamideerd en het gevormde ammoniak in ureum wordt omgezet;

7°. Dat na een eiwitrijken maaltijd het aminozuur-gehalte van het perifere bloed, zooals reeds vermeld, verhoogd is, maar dat dit gehalte in het arteriëele hooger is dan in het veneuse, waaruit men besluit, dat de weefsels aminozuren uit de circulatie hebben opgenomen;

8°. Dat dus de weefsels aminozuren bevatten, ten deele uit het bloed opgenomen, aan den anderen kant ook in de weefsels zelve ontstaan door splitsing van lichaamseiwit, zoodat ook aminozuren van uit de weefsels in het bloed kunnen overgaan;

9°. Dat onder verschillende abnormale omstandigheden, zooals ziekelijke veranderingen van lever of nieren, het aminozuur-gehalte van bloed en urine belangrijk verhoogd kan zijn.

HOOFDSTUK II.

Methodiek.

A. Methode van Sörensen [1]).

Onderzoekingen van SCHIFF [2]) hadden aangetoond, dat een oplossing van aminozuren door toevoeging van geneutraliseerden formol een zure reactie verkreeg, doordat de aminogroep, welke basische eigenschappen heeft, met den formol een verbinding aangaat onder afsplitsing van water, waardoor deze basische eigenschappen verdwijnen en de zure eigenschappen van de carboxylgroep der aminozuren ongehinderd te voorschijn treden.

Uitgaande van deze onderzoekingen heeft SÖRENSEN een methode uitgewerkt om de hoeveelheid der aminozuren te bepalen, door aan een oplossing van deze stoffen geneutraliseerden formol toe te voegen en vervolgens de vrijkomende zuurgroepen met behulp van loog te meten. Bij deze bepalingen hebben wij dus twee reacties, welke voor alanine aldus zijn:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + C\begin{array}{l} \diagup H \\ = O \\ \diagdown H \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHN = CH_2 + H_2O \\ | \\ COOH \end{array}$$

en

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHN = CH_2 + KOH \\ | \\ COOH \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHN = CH_2 + H_2O \\ | \\ COOK \end{array}$$

---

1) Biochem. Zeitschr. 7, 45; 1908.

2) LIEBIG's Annalen 1899, 1901 en 1902.

Wil men nu in een oplossing b.v. van alanine het gehalte aan deze stof bepalen, dan is 't duidelijk, dat zorg gedragen moet worden, dat beide reacties zooveel mogelijk naar rechts verloopen en tevens is het duidelijk, dat men dit kan bewerken door overmaat formol en alcali toe te voegen. Vooral het laatste bleek van groot belang en 't kwam er nu op aan zooveel alcali toe te voegen, dat de reactie zoo volledig mogelijk naar rechts verloopt. Daartoe moet een zekere overmaat toegevoegd worden, waardoor de vloeistof een vrij sterk alcalische reactie verkrijgt. Bij de titratie moet dus tenslotte een dergelijke alcalische reactie steeds bereikt worden en de ervaring heeft geleerd, dat die alcalische reactie, waarbij phenolphtaleïne een donkerroode kleur aanneemt, een geschikte is, waarbij de uit de aminozuren ontstane zuren over 't algemeen geheel als zout aanwezig zijn.

Het spreekt wel van zelf, dat niet voor al dergelijke stoffen dezelfde graad van alcaliciteit noodig is en zoo is ongetwijfeld voor sommige een nog sterkere alcalische reactie gewenscht. Evenwel zooals gezegd, kan men in den regel phenolphtaleïne als indicator met goed gevolg gebruiken. Men moet dus tenslotte titreeren tot deze indicator een donkerroode kleur heeft aangenomen, waarbij men dus kan aannemen, dat bij deze overmaat van alcali de uit de aminozuren ontstane stoffen geheel in zout zijn omgezet.

Bij de berekening moet men dan echter de overmaat loog in aftrek brengen. Zij wordt bepaald door een contrôleoplossing te maken, welke bestaat uit eenzelfde hoeveelheid geneutraliseerden formol, als toegevoegd wordt aan de te onderzoeken vloeistof met zooveel water, als noodig is om de volumina gelijk te maken. Bij deze contrôle-oplossing voegt men nu zooveel cc. alcali, tot men de gewenschte

donkerroode kleur heeft bereikt. Deze contrôle-oplossing, waarin geen zure stoffen aanwezig zijn en de toegevoegde loog dus geheel gediend heeft om de gewenschte alcalische reactie te verkrijgen, geeft dus een maat voor de hoeveelheid alcali, die in de getitreerde vloeistof in overmaat aanwezig is.

Wij zorgen zooveel mogelijk, dat het volumen van de contrôle-oplossing en dat van de te onderzoeken vloeistof gelijk is, daar het volumen, theoretisch gesproken, invloed heeft op de OH-ionen-concentratie, dus ook op de hoeveelheid gebruikte loog. Deze invloed van het volumen is praktisch echter niet groot, als men bedenkt, dat getitreerd wordt met 0.2 norm. barytoplossing en dat één druppel hiervan gelijk staat met 100 cc. 0,0001 normaal baryt, welke oplossing een OH-ionen-concentratie heeft van 10^{-4}, het gehalte aan OH-ionen, waartoe wij titreeren moeten en waarbij phenolphtaleïne een donkerroode kleur aanneemt, zoodat, wanneer het eindvolumen de 100 cc. niet te boven gaat, reeds één druppel 0.2 norm. baryt in staat is, de vloeistof de gewenschte reactie te geven. Om te zorgen, dat het eindvolumen der contrôle-oplossing en der te onderzoeken vloeistof gelijk is, wordt getitreerd zoowel met loog als met zuur van bekende sterkte. Door nu een van beiden toe te voegen in overmaat en met de andere terug te titreeren, kan men aldus zorgen, dat het eindvolumen van beiden gelijk is.

Ten slotte stelde ik mij de vraag, met welke base het best getitreerd zou worden. Ik had te doen met vloeistoffen, die carbonaat en phosphaat bevatten. Deze zouten hebben bij de formoltitratie volgens Sörensen een storenden invloed. Men gaat daarbij uit van een neutrale vloeistof, die men na toevoeging van neutralen formol titreert tot een vrij sterk alcalische reactie. In de neutrale oplossing, waarvan uitgegaan wordt, is het phosphaat aanwezig als een mengsel

van primair en secundair. Men heeft in die oplossing een evenwicht van de ionen H_2PO_4, HPO_4 en H,

$$H_2PO_4 \rightleftarrows HPO_4 + H.$$

Aan het einde der titratie is dit evenwicht aanzienlijk verschoven; er zijn dan voornamelijk HPO_4-ionen naast PO_4-ionen, terwijl de H_2PO_4-ionen bijna verdwenen zijn. Voor de verschuiving van dit evenwicht is evenwel base noodig geweest, phosphaat werkt in de omgeving van het neutrale punt dan ook als een krachtige „buffer" van de reactie; en evenzoo heeft men in neutrale carbonaat-oplossingen een evenwicht tusschen verschillende ionen en moleculen, naast hydrocarbonaat-ionen komen koolzuurmoleculen en enkele carbonaat-ionen voor. Carbonaat werkt bij de reactie-verschuiving, waarmede we hier te maken hebben, eveneens als een krachtige „buffer". De aanwezigheid van carbonaat en phosphaat kan dan ook, bij het gebruik van natriumhydroxyde, bij de titraties tot aanmerkelijk te hooge uitkomsten leiden. In deze gevallen raadt Sörensen dan ook aan, met bariumhydroxyde te titreeren. Wanneer men de vloeistof hiermede aanvankelijk alcalisch maakt, daarbij zorgende, dat er een voldoende hoeveelheid bariumchloride aanwezig is, slaat men alle phosphaat en carbonaat neer als tribariumphosphaat en bariumcarbonaat. Men kan dan deze zouten door filtreeren verwijderen, of eigenlijk is dit niet eens noodig. Wanneer men toch voorzichtig neutraliseert, zorgende, dat er geen overmaat zuur komt, dan lost het bariumphosphaat noch het carbonaat op. Op deze wijze storen dus aanwezige phosphaat en carbonaat bij de titratie niet. Ik heb dan ook steeds van bariumhydroxyde gebruik gemaakt.

Met deze methode heeft men nu het aminozuur-gehalte van bloed en urine bepaald, waarbij zich echter iets voordoet,

dat tot veel misverstand heeft aanleiding gegeven. Urine b.v. wordt eerst met behulp van bariumhydroxyde en bariumchloride van phosphaten en carbonaten bevrijd; daarna wordt het ammoniak verdreven en vervolgens kan men in deze aldus verkregen vloeistof het aminozuur-gehalte volgens SÖRENSEN bepalen. Hiertoe is echter noodig, dat men deze alcalische vloeistof, alvorens men geneutraliseerden formol toevoegt, neutraal maakt, d. w. z. dat het gehalte aan H-ionen gelijk is aan dat der OH-ionen. Is dit laatste niet het geval, maar is de reactie iets alcalisch, dan zal dus een gedeelte der carboxylgroepen, welke vrij komen na toevoeging van formol, gebonden worden aan dit alcali, zoodat bij de titratie deze groepen reeds gebonden zijn en dus minder alcali toegevoegd wordt, dan overeenkomt met de hoeveelheid zuur door den formol in vrijheid gesteld. Om nu te zorgen, dat de concentratie der OH-ionen gelijk is aan die der H-ionen, gebruiken wij gevoelig lakmoespapier als indicator, daar het omslagpunt hiervan gelegen is bij vrijwel neutrale reactie.

Neemt men niet lakmoes, maar b.v. zooals MALFATTI [1]) en ook MESTREBAT [2]) deden, phenolphtaleïne als indicator, dan wordt een fout gemaakt waar HENRIQUES en SÖRENSEN [3]) reeds op wezen. Daar phenolphtaleïne omslaat bij duidelijk alcalische reactie wordt, zooals hierboven uiteengezet, een te lage waarde bij de titratie met de 0.2 norm. barytoplossing, na toevoeging van formol, verkregen.

Uitvoering.

Als indicator gebruikt men een 0.5 % phenolphtaleïneoplossing in 50 % alcohol. Voor formol is de gewone handels-

---

[1]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **61**, 499; 1909.
[2]) Bull. de la Société de Chimie Biol. III, 1919.
[3]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **63**, 27; 1910.

formol van 30—40 % zeer goed te gebruiken. Aan 50 cc. formol voegt men 1 cc. phenolphtaleïne toe en neutraliseert met 0.2 norm. bariumhydroxyde, zoodat de vloeistof lichtrose gekleurd wordt. Voegt men eventueel iets te veel loog toe, zoodat de formol donkerrood gekleurd wordt, dan is dit geen bezwaar, mits men zorgt aan de contrôle-vloeistof en ook aan de te onderzoeken vloeistof evenveel toe te voegen.

Voegen wij b.v. aan beiden 10 cc. van denzelfden, een weinig alcalischen, formol toe, dan behoeven we, om de contrôle-oplossing een donkerroode kleur te doen aannemen, een zekere hoeveelheid loog minder toe te voegen, dan wanneer de formol neutraal was, maar deze zelfde hoeveelheid loog wordt ook bij de titratie in de te onderzoeken vloeistof minder gevonden, zoodat dit bij de berekening geen invloed heeft.

Zooals gezegd, zorgt men er dus voor steeds gelijke hoeveelheden formol toe te voegen aan contrôle-oplossing en te onderzoeken vloeistof.

De contrôle-vloeistof wordt gemaakt door aan 20 cc. gedestilleerd uitgekookt water 10 cc. geneutraliseerden formol toe te voegen. Het uitkoken is noodzakelijk om het koolzuur te verdrijven, dat anders aanleiding geeft bij de titratie met baryt tot een troebelheid, door het zich vormende bariumcarbonaat. Uit een buret laten wij eenige cc. 0.2 norm. baryt toevloeien en dan uit een andere buret 0.2 norm. zoutzuur, tot de vloeistof een lichtrose kleur heeft (Sörensen spreekt dan van het eerste stadium) Vervolgens voegen wij één of meer druppels loog toe, tot de vloeistof duidelijk rood gekleurd is (stadium II).

Van de te onderzoeken vloeistof nemen wij nu een bekende hoeveelheid en wel, daar wij 20 cc. voor de contrôle-vloeistof gebruikt hebben, ook 20 cc., voegen geneutrali-

seerden formol toe en titreeren met baryt tot het geheel donkerrood gekleurd is. Vervolgens wordt weer teruggetitreerd met zoutzuur tot een zwakrose kleur, waarna weer loog toegevoegd wordt tot de kleur van de contrôle-oplossing (stadium II) ongeveer bereikt is Heeft men nu alle oplossingen tot dit tweede stadium getitreerd, dan voegt men aan de contrôle-oplossing nog eenige druppels loog toe, tot de vloeistof donkerrood (stadium III) gekleurd is en titreert de overige oplossingen tot dezelfde kleur. De gezochte waarde wordt nu gevonden door van het volumen van de totale gebruikte hoeveelheid loog, dat van het gebruikte zoutzuur af te trekken en 't aldus verkregen getal te verminderen met het volumen van de hoeveelheid loog, benoodigd om de contrôle-oplossing de gewenschte reactie te geven.

Het aldus verkregen getal geeft dus aan, hoeveel zuur na formoltoevoeging uit de aminozuren in vrijheid gesteld is en daar elke carboxyl-groep correspondeert met een molecuul aminozuur, moet dus het gevonden getal, daar wij uitgaan van een 0.2 norm. baryt-oplossing, vermenigvuldigd worden met $0.2 \times 14 = 2.8$ om het getal te vinden, dat aangeeft de aanwezige amino-stikstof in milligrammen.

Voorbeeld.

a. Contrôle-vloeistof: 20 cc. water + 10 cc. geneutraliseerden formol. Hieraan toegevoegd:

Overmaat $Ba(OH)_2$ 0.2 normaal	.....	5.63 cc.
HCl „ (Stadium I)		5.49 „
		0.14 cc.
$Ba(OH)_2$ 0.2 normaal tot Stadium II	.....	0.05 „
		0.19 cc.
„ „ „ Stadium III	.....	0.12 „
„ „ in totaal	.....	0.31 cc.

b. De te onderzoeken vloeistof is 10 cc. 0.2 norm. alanine-oplossing, welke dus 28 mgr. amino-stikstof bevat. Hieraan wordt toegevoegd 10 cc. water en 10 cc. geneutraliseerde formol. Vervolgens wordt getitreerd:

Overmaat $Ba(OH)_2$ 0.2 normaal	12.89 cc.
HCl „ (Stadium I)	2.87 „
	10.02 cc.
$Ba(OH)_2$ 0.2 normaal tot Stadium II	0.06 „
	10.08 cc.
„ „ „ Stadium III.....	0.19 „
„ „ in totaal.....	10.27 cc.
af contrôle-oplossing.....	0.31 „
	9.96 cc.

In de te onderzoeken vloeistof is dus volgens deze titratie aanwezig $9.96 \times 2.8 = 27.888$ mgr. amino-stikstof, d. i. 99.6% van de werkelijke waarde.

Uit bovenstaand voorbeeld blijkt, dat men voor een bepaling 6 maal de buret moet aflezen. Titreert men nu de contrôle-oplossing in eens tot het derde stadium en evenzoo de te onderzoeken vloeistof, dan behoeft men de buretten maar 2 maal af te lezen, waardoor de kans op afleesfouten geringer wordt. Dit kan men doen, wanneer slechts weinig titraties moeten worden uitgevoerd, daar dan de tijd, die verloopt tusschen het maken der contrôle-vloeistof en 't beeindigen der laatste titratie, zoo klein is, dat dit geen invloed heeft op de kleur der contrôle-oplossing, die door staan aan de lucht door het koolzuur terugloopt.

B. Methode van van Slyke.

Zooals reeds vermeld, hebben aminozuren de eigenschap, met salpeterigzuur te reageeren volgens de vergelijking:

$$\begin{array}{l} R \\ | \\ HCNH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + HNO_2 \rightarrow \begin{array}{l} R \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH \end{array} + H_2O + N^2.$$

Hieruit zien wij dus, dat stikstof in vrijheid wordt gesteld en dat de helft van de ontwikkelde stikstof afkomstig is van aminozuren, terwijl de rest door het salpeterigzuur geleverd wordt.

Van Slyke heeft nu een toestel bedacht, om deze hoeveelheid stikstof te meten. Deze hoeveelheid, gedeeld door twee, geeft dus aan, hoeveel stikstof van het aminozuur afkomstig is. Salpeterigzuur zelf valt uiteen in salpeterzuur en stikstofoxyde, waarbij een groote hoeveelheid van dit gas ontwikkeld wordt. Van Slyke gaat daarom niet uit bij zijn bepalingen van een salpeterigzuur-oplossing, maar bereidt deze in het toestel zelf door ijsazijn en natriumnitriet samen te brengen. Daar nu de ontwikkelde stikstof uit de aminozuren vermengd is met stikstofoxyde, moet dit laatste verwijderd worden. Dit geschied door een alcalische permanganaat-oplossing. Daarna moet dan de hoeveelheid stikstof gemeten worden.

Het toestel, zooals van Slyke dit in principe heeft aanbevolen, bestaat in zijn tegenwoordigen vorm uit drie deelen, welke door middel van gummibuizen beweeglijk ten opzichte van elkaar zijn verbonden, zoodanig, dat nergens lucht in kan dringen. Het geheele toestel is van glas vervaardigd. (Zie fig. 1).

Het eerste gedeelte bestaat uit een vat D, waarin de reactie van aminozuur met het salpeterigzuur plaats grijpt. De inhoud hiervan is ongeveer 15 cc. (maten opgegeven naar het door mij gebruikte toestel). De ballonvormige verwijding aan het boveneinde dient om te verhinderen dat schuim, hetgeen tijdens het schudden ontstaat in de nauwe buis, welke de verbinding vormt van D met de

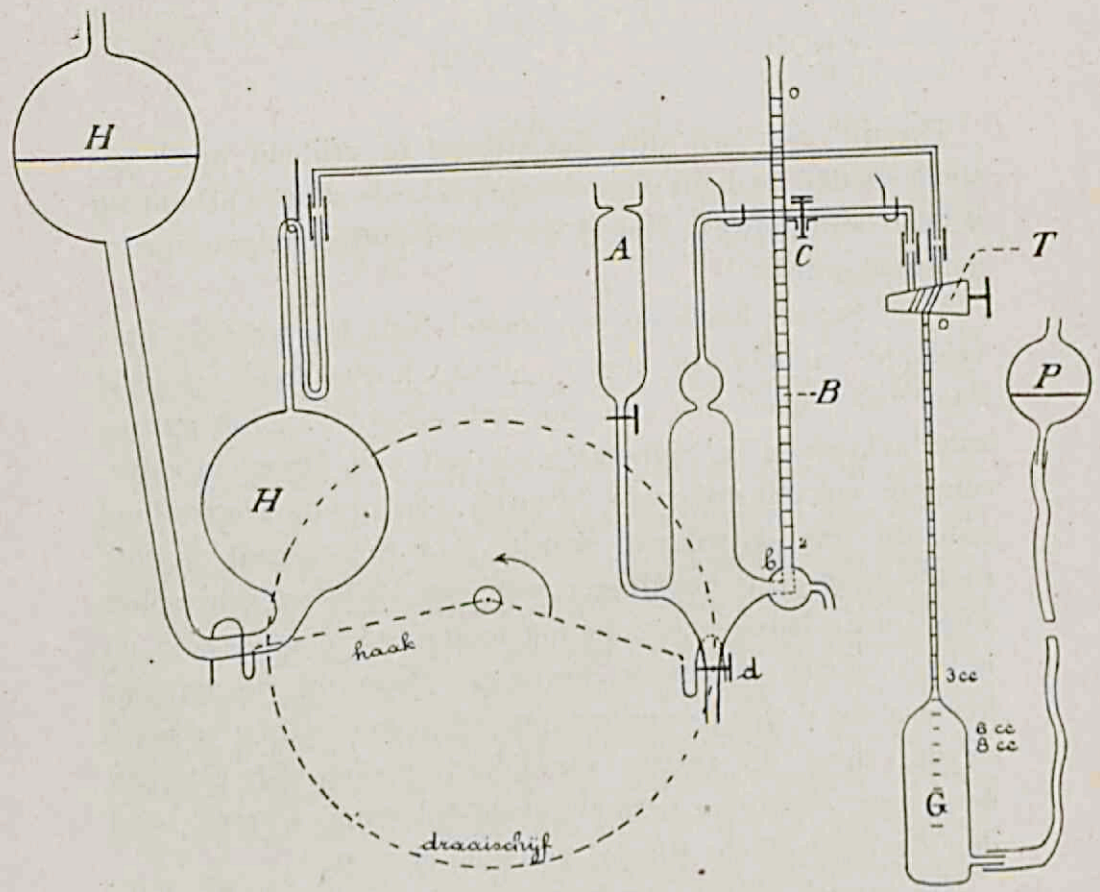


Fig. 1. Toestel van VAN SLYKE.

gasburet G, opstijgt. Ter weerszijden van D en hiermee verbonden, bevinden zich nog twee vaten. Vat A dient om de reagentia in D te brengen, B is een nauwkeurig in 0.01 cc. verdeelde buret van 2 cc. inhoud, welke dient om

de te onderzoeken vloeistof in D te brengen. De verbinding van B met D is ruim, zoodat tijdens het schudden salpeterigzuur gemakkelijk tot kraan b kan doordringen, waardoor verkregen wordt een goede menging van de geheele te onderzoeken vloeistof met het reagens.

Het tweede gedeelte van het toestel bestaat uit de gasburet G. Deze bestaat uit een nauw buisvormig bovengedeelte, dat een inhoud heeft van 3 cc. en nauwkeurig verdeeld is in 0.01 cc. en een verwijd benedengedeelte van ongeveer 25 cc. inhoud, eveneens verdeeld. Dit verwijde gedeelte staat, door middel van een gummi-slang, in verbinding met een vat P, met behulp waarvan men vloeistof in en uit de buret kan laten vloeien. De verbinding van D met G wordt verkregen door een tweemaal rechthoekig omgebogen dikwandige capillaire buis, die aan D is vastgesmolten en aan de gasburet door middel van een gummi-slangetje is bevestigd. Deze capillair heeft in het midden van het horizontale deel een kraan C, welke zoodanig doorboord is, dat men een verbinding van D met G en van D en G met de buitenlucht kan verkrijgen (driewegkraan). Aan het boveneinde der gasburet bevindt zich nog een kraan T, zoodanig doorboord, dat zoowel G met D als G met de Hempel-pipet H, het derde onderdeel van het toestel, verbonden kan worden. De inrichting der Hempel-pipet volgt onmiddellijk uit de teekening. Door den onderlingen stand der bollen is het onmogelijk, dat gas tijdens het schudden uit den ondersten bol kan ontwijken. De verbinding tusschen G en H wordt geleverd door een tweemaal rechthoekig omgebogen buis, met gummi-slangetjes aan H en G verbonden.

Het geheele toestel is bevestigd aan een statief. Dit draagt een juk, waarop aan den eenen kant de Hempel-pipet rust en aan den anderen kant het horizontale deel van de verbindingsbuis tusschen D en G. De gasburet bevindt

zich aan den achterkant van het toestel en de buis, welke H en G verbindt, loopt dus achter het statief.

D en H worden geschud door een electromotor. Deze brengt zijn beweging over op een houten draaischijf, welke tusschen D en H aan het statief is bevestigd. Excentrisch (1.5 c.M. van het midden) hierop is bevestigd een haak, welke om de afvoerkraan van D geslagen wordt, zoodat, bij het draaien van dit rad, D een schuddende beweging krijgt, terwijl wanneer de haak 180° omgeklapt wordt, zij juist grijpt in de verbindingsbuis van de twee bollen van H, waardoor ook deze geschud kan worden

Uitvoering.

Bij het begin der proef is H gevuld, d. w. z. de onderste bol en de verbindingsbuis van H met G, tot de kraan T geheel en de bovenste ballon voor $^1/_3$. Kraan T is gesloten en G en P geheel gevuld met 1 % zwavelzuur-oplossing, evenzoo het stukje van de verbindingsbuis van G met D tot aan de driewegkraan C, welke zoodanig gesteld is, dat D met de buitenlucht in verbinding staat. De kranen a, b en d zijn gesloten. In A brengt men nu $2^1/_2$ cc. ijsazijn en duidt dit volumen door een merkstreep aan. Door a te openen vloeit de ijsazijn in D. Hierna wordt a gesloten en brengt men in A 12 cc. van een 30 % natriumnitriet-oplossing, opent a wederom, waardoor de inhoud in D vloeit, tot de vloeistof in D tot aan kraan C gestegen is. Daarna wordt a gesloten en D eenige seconden geschud. Hierdoor wordt bereikt, dat alle lucht uit het toestel verdreven wordt. Vervolgens sluit men C, zet a open en schudt zoolang, totdat ongeveer 6 cc. vloeistof in D over is, (dit wordt op D aangeteekend), waardoor ruimte vrijkomt voor de te onderzoeken vloeistof. Wanneer dus in D nog 6 cc. vloeistof aanwezig is, wordt C weer geopend, zoodat D

met de buitenlucht in verbinding wordt gesteld en nu precies drie minuten geschud, waardoor gassen in de reagentia opgelost en stikstof ontstaan uit verontreinigingen dier reagentia verdreven worden. Nadat drie minuten geschud is, wordt door C en T te draaien, D met G verbonden. Vervolgens brengt men de te onderzoeken vloeistof in B, laat P zakken, opent b en hevelt een bekende hoeveelheid der te onderzoeken vloeistof uit B in D. Daarna wordt b gesloten en D den voorgeschreven tijd geschud, waardoor dus in de gasburet een mengsel van stikstofoxyde en stikstof wordt opgevangen. Na afloop van het schudden brengt men P onder het niveau van de vloeistof in G, waarna a geopend wordt, waardoor vloeistof uit A de nog in D aanwezige gassen voor zich uitdrijft naar G. Wanneer nu de vloeistof uit D opstijgt in de capillaire buis, sluit men a, daarna T. Alle ontwikkelde gassen bevinden zich nu in G. Vervolgens wordt de kraan T zoo gedraaid, dat G met H in verbinding komt en door P te heffen, hevelt men het gasmengsel in de HEMPEL-pipet, zorg dragend, dat het zwavelzuur de verbindingsbuis geheel vult. Nu wordt T weer gesloten, de haak van D genomen en overgebracht op H en één minuut geschud, waardoor al de stikstofoxyde door het permanganaat geoxydeerd wordt. Daarna opent men T en hevelt de overgebleven stikstof in de gasburet en leest af, na den vloeistofspiegel van P op gelijke hoogte gebracht te hebben met dien in de buret.

Weet men nu de temperatuur en den luchtdruk, dan kan men met behulp van een tabel [1]) gemakkelijk berekenen,

---

[1]) Journ. of Biol. Chem. **12**, 284; 1912. Deze tabel is overgenomen uit GATTERMANN: Praxis des organischen Chemikers, waarbij de opgegeven getallen voor stikstof door twee zijn gedeeld.

met hoeveel milligrammen stikstof de hoeveelheid gas, herleid op 760 m.M. en 0°, overeenkomt, er aan denkend, dat de helft van dit bedrag van de amino-stikstof afkomstig is.

Daar door verontreinigingen van de reagentia altijd gedurende het schudden eenige stikstof ontwikkeld wordt, moet hiervoor een correctie worden aangebracht. De grootte dezer correctie wordt gevonden door een blinde proef. Dit bedrag moet dus van de gevonden waarde bij een bepaling afgetrokken worden.

Niet alleen aminozuren, maar ook andere stoffen, welke in het bloed voorkomen, reageeren met salpeterigzuur, echter veel langzamer dan de aminozuren. Zoo reageert ureum met al zijn stikstof in 8 uur en ammoniak in 2 uur, terwijl aminozuren in 2 tot 5 minuten, afhankelijk van de temperatuur, reageeren. Wil men dan ook met deze methode het aminozuur-gehalte van het bloed bepalen, dan moet men hiermede rekening houden, zooals later zal worden behandeld.

C. Methode van Bang [1]).

Bepaalde men met de beide vorige methoden het aminozuur-gehalte van het bloed direct, deze laatste methode geeft dit gehalte, door van de totale R. N.-waarde van het bloed de ureum-waarde af te trekken. Deze methode is, zooals Bang haar aangeeft, een micro-methode, daar bepalingen worden gedaan in ongeveer 200 mgr. bloed. Hiertoe wordt bloed opgezogen in stukjes dik filtreerpapier. Daarna worden deze papiertjes gedompeld in een extractie-vloeistof, waar-

---

[1]) Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile.

door de stoffen, welke de totale R. N. leveren, uitgetrokken worden, het eiwit neergeslagen wordt en aan het papier blijft kleven.

De extractie-vloeistof wordt, nadat het uittrekken geëindigd is, volgens KJELDAHL behandeld, waardoor al de aanwezige stikstof in ammoniumsulfaat wordt omgezet. Door nu het ammoniak af te destilleeren en op te vangen in zuur van bekende sterkte, kan men dan berekenen, hoeveel stikstof in de extractie-vloeistof aanwezig is. Hieruit kunnen wij berekenen, daar wij weten uit hoeveel milligram bloed deze stikstof-hoeveelheid afkomstig is, het totale R. N.-gehalte van 100 gr. bloed. Met behulp van een andere extractie-vloeistof wordt uit een tweede hoeveelheid bloed het ureum geëxtraheerd en ook hiervan het stikstof-gehalte bepaald. Door nu deze laatste waarde van de eerst gevondene af te trekken, wordt dan volgens BANG de aminozuur-waarde verkregen.

Daar het aminozuur-gehalte berekend wordt uit het verschil van twee bepalingen, waardoor dus de kans op fouten verhoogd is, heeft BANG [1]) in een latere publicatie deze methode zoodanig gewijzigd, dat het aminozuur-gehalte onmiddellijk is te vinden. Hiertoe wordt het papiertje met bloed eerst gedompeld in een vloeistof, welke alleen ureum en geen aminozuren extraheert en daarna in een vloeistof, waardoor de andere extractief-stoffen van het bloed worden verwijderd.

Besproken moeten nu worden: de extractie, de verbranding, de destillatie en de titratie.

I. *Extractie.*

In de eerste plaats moest het ureum verwijderd worden. Hiertoe bedient BANG zich van een mengsel van absoluten

[1]) Bioch. Zeitschr. 87, 262; 1908.

alcohol en aether pro-narcosi. De papiertjes met het bloed worden in dit mengel gelegd en na 5 uur is dan de extractie van het ureum geëindigd. Het aanwezige ammoniak gaat hierbij ook in oplossing. Nadat aldus ureum en ammoniak verwijderd zijn, wordt de alcohol-aether afgegoten en het papiertje nog eens met deze zelfde vloeistof afgewasschen. Hierna kan de extractie der aminozuren beginnen.

Na vele proefnemingen slaagde BANG er in een vloeistof te vinden, die deze aminozuren, maar tevens ook de verdere R. N.-bestanddeelen extraheert. Deze vloeistof moet echter niet alleen in staat zijn aminozuren te extraheeren, maar moet tevens het eiwit neergeslagen houden. De vloeistof wordt als volgt bereid: 10 gr. phosphormolybdeenzuur-natrium en 10 gr. kristalwater-houdend natriumsulfaat (10 aq.) worden in 150 cc. water opgelost. Hieraan wordt toegevoegd 10 druppels 20 percent natronloog en vervolgens gedurende 15 minuten gekookt om het ammoniak te verdrijven. Daarna brengt men de oplossing in een kolf, voegt 30 cc. zuiver geconcentreerd zwavelzuur toe en vult bij tot 2 L.

De extractie met deze vloeistof duurt één uur.

II. *Verbranding.*

De verbranding heeft plaats in een KJELDAHL-kolf met langen hals van 100 cc. inhoud. Hierin wordt de extractie-vloeistof overgebracht en 1 cc. zuiver geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd.

Hierna wordt de kolf verhit tot al het water verdampt is, als wanneer de vloeistof lichtgeel gekleurd is. Nu voegt men 1 druppel alcohol toe, waardoor de verbranding versneld wordt en verhit verder boven een draadnetje, totdat het geheel een lichtgroene kleur heeft aangenomen, waarbij de verbranding geëindigd is. Men behoeft geen katalysator toe te voegen, daar het in de oplossing aanwezige molybdeen

als zoodanig werkt. Nadat de verbranding volledig is, laat men de kolf afkoelen en voegt 10 cc. gedestilleerd water toe.

III. *Destillatie,* (zie fig. 3 bl. 89).

De destillatie van het ammoniak heeft plaats uit de KJELDAHL-kolf. Deze wordt gesloten met een dubbeldoorboorde stop. Door de eene opening gaat een buis, welke tot aan den bodem der kolf reikt, even buiten de kolf omgebogen is en in verbinding staat met een kookkolf. Deze buis draagt aan den horizontalen tak een zijbuisje, waarop een trechtertje is bevestigd. Door de tweede opening gaat een wijdere buis, die tot vlak onder den rand van de stop reikt en boven de stop een overspat-inrichting volgens HOPKINS draagt. Boven de overspat-inrichting wordt deze buis veel wijder en is bijna rechthoekig omgebogen Het uiteinde hiervan is met een stop gesloten, waardoor een zilveren buisje gaat, dat weer rechthoekig ombuigt en aan het verticale eind een klein koperen koelertje draagt.

De destillatie heeft plaats door stoom, welke uit de kookkolf ontwikkeld wordt en door de KJELDAHL-kolf strijkt, welker inhoud met behulp van verzadigde natronloog alcalisch gemaakt is. De inhoud der KJELDAHL-kolf gaat door den stoom koken, waardoor het ammoniak verdreven wordt. Onder het uiteinde van het zilveren buisje plaatst men een kolfje met een bepaalde hoeveelheid zuur van bekende sterkte, waarin het ammoniak wordt opgevangen.

IV. *Titratie.*

Daar BANG bij zijn methode uitgaat van 200 mgr. bloed, dat ongeveer 0.024 mgr. stikstof levert, spreekt het van zelf, dat de sterkte van het zuur, waarin het ammoniak opgevangen wordt, heel gering moet zijn. BANG gebruikt

dan ook 0.005 norm. zwavelzuur. De overgebleven hoeveelheid zuur moet nu bepaald worden. Daar er geen indicator bestaat, geschikt voor het titreeren van dergelijke geringe hoeveelheden zuur, bepaalde BANG het overgebleven zuur langs jodometrischen weg. Brengt men kaliumjodide en kaliumjodaat te samen en voegt men zuur toe, dan wordt een hoeveelheid jodium in vrijheid gesteld, die aequivalent is met de toegevoegde hoeveelheid zuur, volgens de vergelijking:

$$5\,KJ + KJO_3 + 6\,HCl \rightarrow 6\,KCl + 3\,H_2O + 6\,J.$$

De hoeveelheid in vrijheid gesteld jodium kan men met natriumthiosulfaat van bekende sterkte meten, volgens de vergelijking:

$$2\,Na_2S_2O_3 + J_2 \rightarrow 2\,NaJ + Na_2S_4O_6.$$

Titreert men nu het jodium met een 0.005 norm. thiosulfaat-oplossing met amylum als indicator, dan krijgt men met een halven druppel thiosulfaat een duidelijken omslag

BANG gebruikt bij deze bepalingen 1 tot 6 cc. 0.005 norm. zwavelzuur met 10 tot 15 cc. water. Hieraan wordt toegevoegd 2 cc. van een 5 percent joodkali-oplossing en 2 druppels 4 percent kaliumjodaat. Laat men het geheel nu 5 minuten staan, dan is de reactie tot stand gekomen en kan men tot de titratie overgaan.

Daar wij uitgaan van een 0.005 norm. oplossing, wijst dus 1 cc. thiosulfaat aan 0.07 mgr. stikstof.

Vinden wij dus bij een bepaling, dat x cc. 0.005 norm. thiosulfaat noodig is geweest voor de jodium-titratie en hadden wij 2 cc. 0.005 norm. zwavelzuur genomen om het ammoniak in op te vangen, dan is dus aan ammoniak-stikstof aanwezig $(2-x) \times 0.07$ mgr.

Daar nu de gebruikte stoffen altijd eenigzins ammoniak-

houdend zijn, moet hiervoor een correctie aangebracht worden. Deze bepaalt men door een blinde proef. De gevonden waarde moet dus met dit bedrag verminderd worden.

Uitvoering.

Het papiertje wordt met een torsie-balans van HARTMANN en BRAUN gewogen, vervolgens het bloed er in opgezogen en wederom gewogen. Uit het verschil van beide wegingen weet men de hoeveelheid bloed. Vervolgens laat men het papiertje 5 minuten drogen, waarna het in 10 cc. van 't alcohol-aether-mengsel gedompeld wordt, zoodat de vloeistof nog eenige millimeters boven den bovenrand van het papiertje staat. Nadat de extractie 5 uur geduurd heeft, giet men den alcohol-aether af en wascht na met 10 cc. van dezelfde vloeistof Daarna voegt men 10 cc. der phosphormolybdeenzuur-oplossing toe en laat 1 uur staan. Vervolgens filtreert men door een klein, ammoniak-vrij, met gedestilleerd water uitgewasschen, filter in de KJELDAHL-kolf en wascht het papiertje na met 10 cc. water, dat eveneens door het filter wordt gegoten. Hierna voegt men in de kolf 1 cc. geconcentreerd zwavelzuur toe en laat het water, onder voortdurend schudden, boven de vrije vlam verdampen, totdat vloeistof een licht-gele kleur krijgt, ten teeken dat de verbranding begonnen is. Nu laat men afkoelen, voegt één druppel alcohol toe en verhit verder boven een kleine vlam op een draadnetje, waarbij geen gevaar voor spatten bestaat, tot de vloeistof een lichtgroene kleur aanneemt; dan is de verbranding afgeloopen.

Nadat dit het geval is, laat men de kolf afkoelen, waarna 10 cc. water toegevoegd wordt. Hierna zet men de kolf in het destillatietoestel. Onder het uiteinde van het zilveren buisje plaatst men nu een kolfje, waarin 2 cc.

0.005 norm. zwavelzuur + 10 cc. water aanwezig is, zoodanig, dat het buisje in de vloeistof gedompeld is, laat door het trechtertje 3 cc. verzadigde loog toevloeien, zet de vlam onder de kookkolf en destilleert van 't moment, dat het water kookt, gedurende 2 minuten.

Aan het einde der proef draait men de klem, waarmee het trechtertje afgesloten is open en verwijdert de vlam. Aan het kolfje met titreerzuur voegt men 2 cc. 5 percent joodkali en 2 druppels 4 percent kaliumjodaat toe, wacht 5 minuten, waarna met thiosulfaat getitreerd wordt. Van de aldus gevonden waarde trekt men de hoeveelheid stikstof, gevonden bij een blinde proef, af. Daar men weet uit hoeveel mgr. bloed deze hoeveelheid stikstof afkomstig is, kan men gemakkelijk hieruit berekenen, hoeveel mgr. dan in 100 cc. bloed aanwezig moeten zijn.

HOOFDSTUK III.

Eigen onderzoekingen.

A. Methode van Sörensen.

Nauwkeurigheid der uitkomsten, bijzonderheden bij de uitvoering.

Om mij van de bruikbaarheid dezer methode te overtuigen, deed ik eerst een aantal bepalingen met een aminozuur-oplossing van bekende sterkte. Hiervoor gebruikte ik alanine (Kahlbaum). 3 gr. dezer stof werden gedurende een uur bij 115° gedroogd. Hiervan werd dan 2.2278 gr. in 250 cc. gedestilleerd water opgelost. Daar het moleculairgewicht van alanine 89.1 is, is deze oplossing dus 0.1 normaal. Een bekende hoeveelheid hiervan werd nu met behulp van een pipet gemeten in een Erlenmeyer-kolfje van 100 cc., vervolgens met gedestilleerd water aangevuld tot 20 cc. en tenslotte 10 cc. geneutraliseerde formol toegevoegd, waarna met behulp van 0.2 norm. baryt en zoutzuur getitreerd werd tot het derde stadium van Sörensen. Zooals eerder reeds gezegd, titreerde ik ineens tot het derde stadium, met overslaan van het tweede, waardoor men de buret minder dikwijls behoeft af te lezen.

Met deze alanine-oplossing werden de volgende uitkomsten verkregen, welke in Staat I zijn samengevat.

STAAT I.

Bepalingen van het gehalte aan alanine volgens SÖRENSEN.

Genomen hoeveelheid alanine, in mgr. stikstof.	Gebruikte hoeveelheid $\frac{N}{5}$ $Ba(OH)_2$ in cc.	Gevonden hoeveelheid alanine, in mgr. stikstof.	Gevonden hoeveelheid alanine in %.
28	10	28	100
14	5	14	100
7	2.51	7.028	100.4
7	2.51	7.028	100.4
4.2	1.57	4.396	105
2.8	1.02	2.856	102
2.8	0.92	2.576	92
1.4	0.53	1.484	106
0.756	0.32	0.896	118
0.4	0.32	0.896	224
0.378	0.11	0.308	81
0.238	0.11	0.308	130

Uit bovenstaanden staat zien wij, dat 1 cc. 0.1 norm. alanine, bevattend 1.4 mgr. amino-stikstof, met vrij groote nauwkeurigheid is terug te vinden, doch hoeveelheden geringer dan 1 cc vrij groote fouten geven.

Voordat ik nu overging tot de bepaling van het amino-stikstof-gehalte van het bloed, heb ik eerst dit gehalte in de urine bepaald, in de eerste plaats om mij te oefenen in de techniek en in de tweede plaats om later zoo noodig, ook dit aminozuur-gehalte te kunnen bepalen.

Bepaling van de amino-stikstof in de urine

Ik volgde hierbij de methode zooals HENRIQUES [1]) aangegeven heeft, waarbij met behulp van bariumchloride en bariumhydroxyde, phosphaten en carbonaten verwijderd worden.

[1]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **60**, 1; 1909.

Daar de eigen kleur der urine bij de titratie stoort, wordt deze verwijderd met beenderkool. Daar deze stof echter ook aminozuren adsorbeert, moet volgens BANG [1]) alcohol toegevoegd worden, tot de concentratie 20 % is, daar dan geen adsorptie van aminozuren door de kool plaats heeft.

Daar het ammoniak, dat altijd in vrij groote hoeveelheid in de urine aanwezig is, eveneens met de formoltitratie bepaald wordt en wij dus ten slotte de som vinden van aminozuur- en ammoniak-stikstof, moet deze laatste afzonderlijk bepaald en van de eerste waarde afgetrokken worden.

Het ammoniak bepaalde ik met het toestel van STEYRER [2]) (zie fig. 2). Het principe dezer methode is, dat het ammoniak verdreven wordt door bij 37° onder verminderden druk en bij door calciumhydroxyde alcalische reactie, lucht door te leiden Het toestel bestaat uit een destillatie-kolf **B** met langen hals, afgesloten met een dubbel doorboorde kurk. Door de eene opening gaat een trechter, waardoor kalkmelk toegevoegd kan worden en waarvan de steel halverwege den hals der kolf reikt, terwijl door de andere opening een rechthoekig omgebogen buis gaat, welke reikt tot onder in de kolf en aan het ondereinde zeer nauw is uitgetrokken. Het rechthoekig omgebogen stuk sluit juist aan een waschflesch A met zwavelzuur gevuld. Deze dient om de doorgeleide lucht van ammoniak te zuiveren. Aan den hals van de destillatie-kolf is verder nog aangesmolten een zijbuisje, dat uitmondt in een tweede kolf C, waarin een bekende hoeveelheid 0.1 norm. zwavelzuur zich bevindt en die in koud water gekoeld wordt. Aan den hals van deze kolf is wederom een zijbuisje gesmolten, dat verbonden is met een flesch D. Deze flesch is gesloten

---

[1]) Biochem. Zeitschr. **72**; 1916.

[2]) Beitr. z chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 312; 1902.

door een driemaal doorboorde kurk. Bovengenoemd buisje mondt uit in de flesch. Door de tweede opening wordt een kwikmanometer E aangebracht en door de derde opening gaat ten slotte een buis, welke in verbinding staat met een krachtige waterstraal-zuigpomp. De destillatie-kolf is geplaatst in een thermostaat, die ingesteld is op een temperatuur van 37°. Door nu één uur lang bij 18—20 m.M. kwikdruk te destilleeren, terwijl de luchttoevoer geregeld wordt door een klemkraan K, wordt het ammoniak totaal verwijderd.

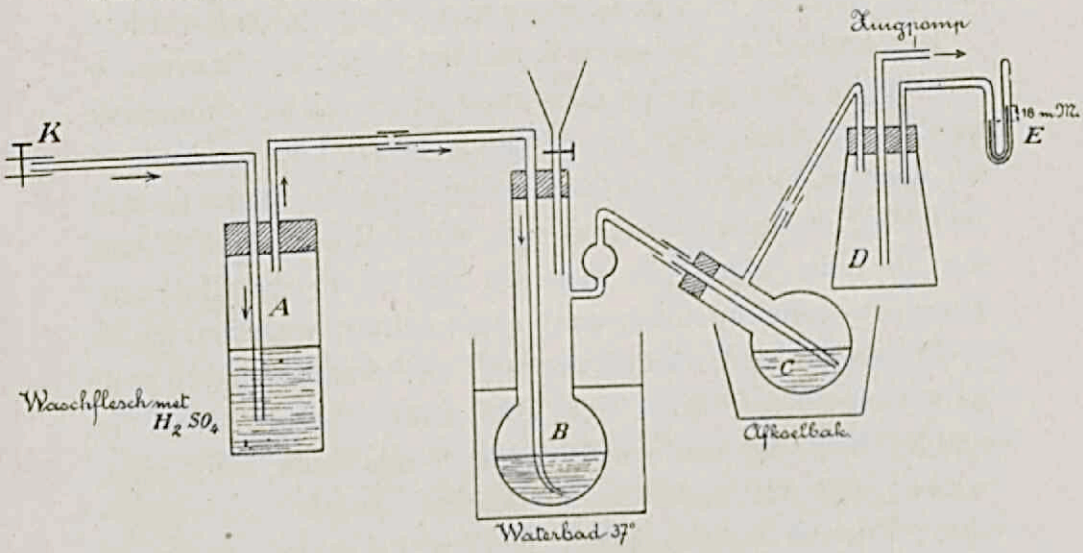


Fig. 2. Toestel van Steyrer.

Uitvoering.

50 cc. urine worden in een maatkolf van 100 cc. gepipetteerd, waarna men 2 gr. bariumchloride in substantie en eenige druppels phenolphtaleïne toevoegt. Vervolgens voegt men verzadigde baryt-oplossing toe, tot het geheel lichtrose gekleurd is en dan nog 8—10 cc. baryt in overmaat.

Nadat de kolf goed geschud is, blijft zij 15 minuten staan, waardoor phosphaten en carbonaten volledig neergeslagen worden; dan voegt men 20 cc. 96 % alcohol en 2 gr. gezuiverde beenderkool toe, vult aan tot de maatstreep met

gedestilleerd water en schudt krachtig gedurende eenige minuten, waarna gefiltreerd wordt.

40 cc. van dit filtraat wordt gebracht in de destillatie-kolf van het toestel van STEYRER. Zekerheidshalve voegde ik aan de reeds alcalische vloeistof door den trechter nog 50 cc. kalkmelk toe, mat in de opvangkolf 10 cc. 0.1 norm. zwavelzuur af en destilleerde een uur lang bij 20 mM. kwikdruk en 37°.

Als de destillatie geëindigd is, brengt men het zwavelzuur uit kolf C, zonder verlies over in een kolfje, waarna met 0.1 norm. natriumhydroxyde het niet gebonden zuur, met methyloranje als indicator, bepaald wordt. Daar wij weten hoeveel zuur oorspronkelijk aanwezig was, kunnen wij dus berekenen, welk gedeelte door ammoniak gebonden is, waaruit zich dan verder de hoeveelheid ammoniak-stikstof gemakkelijk in milligrammen laat vinden, door het aantal cc. gebonden zuur met 1.4 te vermenigvuldigen.

Daar de kalkmelk echter steeds ammoniak-houdend is, moet men het gehalte van die stof door een blinde proef bepalen. In mijn geval bedroeg dit steeds 0.966 mgr. ammoniak-stikstof voor 50 cc. kalkmelk.

Een tweede 40 cc. van het filtraat wordt tegenover lakmoes geneutraliseerd, vervolgens wordt 10 cc. geneutraliseerde formol toegevoegd, waarna volgens SÖRENSEN getitreerd wordt.

In deze laatste vloeistof bepalen wij dus de ammoniak- en de amino-stikstof, terwijl in het eerste deel van het filtraat alleen de hoeveelheid ammoniak-stikstof bepaald wordt; door deze waarden van elkaar af te trekken, vinden wij dus de amino-stikstof in 40 cc. filtraat of in 20 cc. urine.

Om mij te overtuigen, dat, aldus te werk gaande, goede uitkomsten verkregen konden worden, deed ik eerst eenige aminozuur-bepalingen in urine; vervolgens voegde ik aan de urine een bekende hoeveelheid alanine toe en trachtte

deze aldus terug te vinden. De uitkomsten vindt men in den volgenden Staat II.

STAAT II.

Bepalingen van aan de urine toegevoegde alanine volgens SÖRENSEN.

genomen cc. urine	aminozuur- + NH_3-stikstof in 50 cc. urine.	NH_3-stikstof in 50 cc. urine.	amino-stikstof in 50 cc. urine.	alanine-stikstof	
				toegevoegd in 50 cc. urine.	gevonden in 50 cc. urine.
50	16.38	12.25	4.13	—	—
50	17.71	12.25	5.46	1.4	1.33
50	9.66	6.58	3.08	—	—
50	11.06	6.58	4.48	1.4	1.4
50	32.01	25.44	6.57	—	—
50	33.32	25.44	7.88	1.4	1.31

Uit bovenstaanden staat blijkt dus, dat het gehalte aan aminozuren in de urine is te bepalen en dat toegevoegde alanine op deze wijze zeer nauwkeurig is terug te vinden.

Later heb ik deze methode zoodanig gewijzigd, dat ik het amino-stikstof-gehalte direct bepaalde en niet uit het verschil tusschen ammoniak- + amino-stikstof en ammoniak-stikstof berekende.

Hiertoe wordt 50 cc. van het filtraat, dat door het toegevoegde baryt in overmaat reeds alcalisch reageert, in het toestel van STEYRER gebracht en van ammoniak bevrijd. Daar het koolzuur van de lucht het aanwezige bariumhydroxyde echter langzamerhand zou kunnen neutraliseeren, waardoor dan het uitdrijven van het ammoniak niet goed meer zou slagen, plaatste ik voor de waschflesch met zwavelzuur nog een waschflesch met sterke natronloog, waardoor het koolzuur der lucht tegengehouden wordt. Nadat de destillatie geëindigd is, brengt men den inhoud

der destillatie-kolf over in een Erlenmeyer-kolfje van 100 cc. Is de vloeistof eenigszins troebel, dan filtreert men door een ammoniak-vrij, uitgewasschen filter. Vervolgens neutraliseert men tegenover lakmoespapier, voegt formol toe en titreert met baryt.

Hierdoor vinden wij het amino-stikstof-gehalte der urine dus niet uit het verschil van twee bepalingen, maar ineens, waardoor het geheel aan nauwkeurigheid wint.

Bepaling van de amino-stikstof in het bloed.

Wil men het aminozuur-gehalte van het bloed bepalen volgens de methode van Sörensen, dan moet in de eerste plaats het eiwit verwijderd worden en in de tweede plaats moet de aldus eiwitvrije vloeistof geheel kleurloos en helder zijn om hierin met goed gevolg de titratie te kunnen uitvoeren.

A. Constantino [1]) verwijderde het eiwit door het bloed te verdunnen met een 5-voudige hoeveelheid 2 % sublimaatoplossing, welke 2 % zoutzuur bevat. Na één uur was dan het eiwit neergeslagen, waarna gecentrifugeerd en het centrifugaat afgepipetteerd en gefiltreerd werd. Van 't aldus verkregen filtraat werd een bekende hoeveelheid afgenomen en behandeld met zwavelwaterstof om 't aanwezige sublimaat te verwijderen. (Toen ik deze methode probeerde was na 80 minuten doorleiden van zwavelwaterstof al het kwik verwijderd). Vervolgens werd gefiltreerd en van het filtraat een bekende hoeveelheid genomen. Deze vloeistof werd door een luchtstroom door te leiden van zwavelwaterstof bevrijd (90 minuten), waarna geneutraliseerd en in vacuo bij 50°, ingedampt werd; daarna moet alcalisch gemaakt en het ammoniak in vacuo afgedestilleerd worden Onnoodig te zeggen, dat deze methode,

[1]) Biochem. Zeitschr. **55**, 419; 1913.

wanneer men een aantal proeven wenscht te doen, onbruikbaar is. Voor één bepaling heeft men ongeveer 2 dagen noodig, terwijl het herhaald filtreeren en 't overbrengen in andere vaten steeds verlies geeft en phosphaten en carbonaten nog steeds in de ten slotte verkregen vloeistof aanwezig zijn.

Ik moest dus omzien naar een andere manier om het bloed geheel van eiwit te bevrijden en waarbij ik een heldere, ongekleurde vloeistof verkreeg. Daartoe ben ik uitgegaan van een oplossing, zooals BANG opgeeft voor zijn suikerbepalingen in bloed. Deze oplossing is als volgt samengesteld: uranilacetaat 0.15 gr.; kaliumchloride 16 gr.; zoutzuur 1 % 19 cc.; aqua ad 100 cc. Ging ik nu van deze oplossing uit, dan bleek, dat ik het bloed 7 maal hiermee moest verdunnen om een van eiwit bevrijd filtraat te verkrijgen, dat echter door het aanwezige uranilacetaat in overmaat lichtgeel gekleurd was. Maakte ik dit filtraat echter alcalisch met baryt, dan sloeg het uranilacetaat neer, waarna een glasheldere, geheel kleurlooze vloeistof overbleef. Uit deze proef bleek dus, dat uranilacetaat voor mijn onderzoek een zeer geschikt middel was om bloed van eiwit te bevrijden, alleen was 't nadeelig, dat 7 maal verdund moest worden om het eiwit te verwijderen, zoodat ingedampt moest worden voor tot de titratie kon worden overgegaan. Om dit bezwaar te ondervangen heb ik, na een aantal proefnemingen, een oplossing gevonden, die bij 3 maal verdunnen van bloed een filtraat geeft, waarin het amino-stikstof-gehalte bepaald kon worden, nadat het overtollige uranil met baryt verwijderd was. De xanthoproteïne reactie in dit filtraat was uiterst zwak positief, zoodat een spoor eiwit, dat bij de titratie echter niet stoort, aanwezig is. Deze oplossing, gebruikt om het bloed van eiwit te bevrijden, is als volgt samengesteld: uranilacetaat 1.5 gr.; kaliumchloride 6 gr ; aqua ad 100.

Uitvoering.

25 cc. bloed wordt met 50 cc. van bovengenoemde oplossing vermengd, goed geschud en gecentrifugeerd gedurende 20—30 min.. Het lichtgele centrifugaat wordt door een droog filter gefiltreerd en aan een bekende hoeveelheid hiervan voegt men $^1/_2$ gr. bariumchloride en 5 cc. baryt toe, laat 15 minuten staan, waardoor carbonaten, phosphaten en het uranilacetaat neerslaan. Ten slotte wordt wederom door een droog filter gefiltreerd en van het glasheldere filtraat een bekende hoeveelheid genomen, geneutraliseerd tegenover gevoelig lakmoespapier, 10 cc. geneutraliseerde formol toegevoegd en getitreerd volgens SÖRENSEN. Op deze wijze bepalen wij dus de aminozure- + de ammoniak-stikstof, welke zich in het bloed bevindt.

Om mij te overtuigen, dat, aldus te werk gaande, het aminozuur-gehalte van het bloed is te bepalen, heb ik eerst eenige dubbelbepalingen in hetzelfde bloed (van paard of rund) gedaan. De uitkomsten worden in den volgenden Staat III gegeven.

STAAT III.

Bepalingen van het gehalte aan amino-stikstof in bloed, volgens SÖRENSEN.

Genomen aantal cc. bloed.	Gevonden aan amino-stikstof		Verschil uitgedrukt in cc. 0.2 norm. $Ba(OH)_2$
	Bepaling I.	Bepaling II.	
25	2.70	2.50	0.07
25	3.18	2.93	0.09
25	6.68	6.34	0.12
25	2.20	2.50	0.10

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat de fout welke gemaakt wordt overeenkomt met ongeveer 0.1 cc. 0.2 norm. baryt. Deze fout is, zooals ook CONSTANTINO aangeeft, te wijten

aan de methode zelf. Nemen wij dus het gemiddelde van twee bepalingen, dan is de kans, dat een fout van ongeveer 10 % gemaakt wordt, zeer gering en zullen wij dan ook de werkelijke waarde van het aminozuur-gehalte zeer dicht nabij komen.

Om mij nog verder te overtuigen, dat volgens deze methode het aminozuur-gehalte van het bloed is te bepalen, deed ik een aantal bepalingen, waarbij ik aan het bloed een bekende hoeveelheid alanine toevoegde. De uitkomsten zijn in Staat IV samengevat. Bij de eerste 3 bepalingen, waar ik uitging van 25 cc. bloed, zijn dubbelbepalingen verricht, bij de laatste twee niet. Bij proef 2 en 4 was mij de toegevoegde hoeveelheid alanine onbekend.

STAAT IV.

Bepalingen van aan het bloed toegevoegde alanine volgens SÖRENSEN.

No.	Bepaling in cc. bloed.	toegevoegde alanine-stikstof in mgr.	gevonden amino-stikstof in mgr.	gemiddelde van twee bepalingen	gevonden alanine-stikstof in mgr.	fout in %.
Bloedmonster 1	25	—	2.427	2.398	—	
»	25	—	2.369		—	
»	25	3.5	6.604	6.546	4.148	+ 16
»	25	3.5	6.488			
Bloedmonster 2	25	—	2.084	2.133	—	
»	25	—	2.182		—	
»	25	3.01	5.086	5.186	3 053	+ 1.3
»	35	3.01	5.286			
Bloedmonster 3	25	—	2.708	2 6053	—	
»	25	—	2.503		—	
»	25	3 5	6.226	6.054	3.45	— 1.4
»	25	3 5	5.883			
Bloedmonster 4	100	—	5.595	—		
»	100	5.0	10.744	—	5.15	+ 3
Bloedmonster 5	25	—	1.135	—		
»	25	7.0	7.915	—	6.78	— 3

Uit bovenstaande proeven blijkt dus duidelijk, dat de methode van SÖRENSEN zeer geschikt is, om de hoeveelheid aminozuren in 25 cc. bloed te bepalen. Deze methode biedt, wanneer men eenmaal geoefend is, geen bijzondere technische moeilijkheden, behalve het neutraliseeren en men kan in 2 uur tijds gemakkelijk 2 analysen uitvoeren, indien men over een centrifuge beschikt, waarmee 150 cc. tegelijk gecentrifugeerd kan worden.

Zooals reeds gezegd, bepaalt men, wanneer werkend als hierboven aangegeven, de aminozure- + de ammoniakstikstof Daar het ammoniak-gehalte van het bloed onder normale omstandigheden zeer gering is, zal men hierbij echter geen groote fout maken, wanneer normaal bloed wordt onderzocht. Daar de gebruikte reagentia echter ook ammoniak-houdend zijn, zou hiervoor een correctie aangebracht moeten worden; daar wij echter zoodoende de aminozuur-waarde vinden uit het verschil van twee bepalingen, waardoor de methode noodzakelijkerwijze aan nauwkeurigheid verliest, besloot ik het ammoniak te verwijderen. Dit kan heel gemakkelijk geschieden, door het van eiwit en uranilacetaat bevrijde filtraat, dat door toevoeging van de baryt reeds alcalisch is, in een porceleinen uitdampschaal gedurende 8 minuten te koken. Daar gedurende het koken de vloeistof troebel wordt door het zich vormende bariumcarbonaat, filtreert men de aldus van ammoniak bevrijde vloeistof door een klein, 3 maal met gedestilleerd water uitgewasschen en dus ammoniakvrij filter en spoelt het filter 3 maal met eenige cc. water na, zoodat niets verloren gaat.

Dat op deze wijze het geheel niet aan nauwkeurigheid inboet, bewijst proef 4 in Staat IV, waarbij het ammoniak op deze wijze verdreven is.

Tenslotte is gebleken, dat in hoeveelheden minder dan 25 cc. bloed, het aminozuur-gehalte niet meer met voldoende nauwkeurigheid is te bepalen.

B. Methode van van Slyke.

Daar de ijsazijn en het nitriet, welke bij deze methode gebruikt worden, wanneer samen geschud, behalve stikstofoxyde ook eenig stikstofgas leveren, moest in de eerste plaats nagegaan worden of deze hoeveelheid stikstof steeds gelijk was, wanneer met dezelfde hoeveelheid reagentia gelijken tijd geschud werd. Daar deze hoeveelheid stikstof niet afkomstig is van de te bepalen hoeveelheid aminozuren, moet zij van de gevonden waarde na de bepaling afgetrokken worden. Dit is de z.g. correctie-waarde.

Om deze hoeveelheid te bepalen wordt als volgt te werk gegaan: Na 2.5 cc. ijsazijn en 13 cc. nitriet in het toestel gebracht te hebben (van welk mengsel de helft weer in A terug wordt gedreven), werd 4 minuten geschud. Het gas, dat gevormd was, werd nu in de HEMPEL-pipet gebracht en na schudden gedurende één minuut, de overblijvende stikstof in de gasburet teruggeheveld en afgelezen. Er had zich 0.105 cc. stikstofgas ontwikkeld. Om na te gaan of de stikstofoxyde volledig door het permanganaat was geoxydeerd en of de oplosbaarheid van de stikstof in deze vloeistof niet zou storen, werd deze zelfde hoeveelheid stikstof weer in de HEMPEL-pipet gebracht en gedurende 3 minuten krachtig geschud. Daarna werd het gas weer in de gasburet gemeten en er bleek nog 0.002 cc. gas door het permanganaat te zijn gebonden. Praktisch kunnen wij dus zeggen, dat na 1 minuut schudden de stikstofoxyde volledig uit het gasmengsel is verdwenen en dat de oplosbaarheid van de stikstof hier te klein is, om in aanmerking te komen.

Vervolgens werden een aantal correctie-bepalingen uitgevoerd. Er werd 4 minuten geschud en 1 minuut in de HEMPEL-pipet. Ik verkreeg hierbij:

		Barometer.	Temp.	
I.	0.105 cc. stikstofgas	775	12° = 0.0061	mgr. stikstof
II.	0.110 „	—	14° = 0.0064	„
III.	0.112 „	—	15° = 0.0065	„
IV.	0.114 „	—	15° = 0.0066	„

Uit deze bepalingen blijkt dus, dat wanneer bij ongeveer constante temperatuur geschud wordt, de uitkomsten zeer bevredigend zijn. Alleen bij 12° kreeg ik een iets te lage waarde. Men doet dus het beste zooveel mogelijk bij constante temperatuur te werken.

Vervolgens werd een aantal bepalingen gedaan met een bekende hoeveelheid aminozuur, waarvan de uitkomsten in Staat V zijn samengevat Hierbij is de besproken correctie aangebracht en werd 5 minuten geschud.

STAAT V.

Bepalingen van het gehalte aan alanine, volgens VAN SLYKE, *waarbij 5 minuten geschud werd.*

Genomen alanine in mgr. stikstof.	Gevonden alanine in mgr. stikstof.	Fout uitgedrukt in %.
0.7	0.710	+ 1.4
0.7	0.678	— 3
0.7	0.674	— 3.7
0.7	0.688	— 1.7
0.7	0.688	— 1.7
0.35	0.324	— 7.4
0.35	0.325	— 7.1
0.35	0.331	— 5.4
0.35	0.334	— 4.5
0.07	0.069	— 1.4
0.07	0.053	— 25
0.07	0.078	+ 11

Uit bovenstaand staatje volgt, dat bijna altijd een te lage waarde werd gevonden, vandaar dat ik besloot 1 minuut langer te schudden. De uitkomsten hierbij verkregen zijn in Staat VI samengevat.

STAAT VI.

Bepalingen van het gehalte aan alanine, volgens VAN SLYKE, *waarbij 6 minuten geschud werd.*

Genomen alanine in mgr. stikstof	Gevonden alanine in mgr. stikstof.	Fout uitgedrukt in %.
0.07	0.0706	+ 1
0.07	0.0713	+ 2
0.07	0.0718	+ 2.5
0.07	0.0741	+ 6
0.14	0.1514	+ 8
0.14	0.1497	+ 7
0.14	0.1489	+ 6
0.14	0.1486	+ 6

Ook werden nog twee bepalingen met glycocoll uitgevoerd waarvan de uitkomst in Staat VII zijn samengevat.

STAAT VII.

Bepalingen van het gehalte aan glycocoll, volgens VAN SLYKE, *waarbij 6 minuten geschud werd.*

Genomen glycocoll in mgr. stikstof	Gevonden glycocoll in mgr. stikstof.	Fout uitgedrukt in %.
1.4	1.409	0.75
1.4	1.403	0.25

Uit bovenstaande staten volgt, dat wanneer 5 minuten geschud wordt, bijna steeds te lage waarden worden gevonden, terwijl, wanneer 1 minuut langer geschud wordt, deze

waarden altijd te hoog zijn, maar dat de fout kleiner is, dan wanneer maar 5 minuten geschud wordt. Zoo zien wij b.v. uit staat V, dat een hoeveelheid alanine, welke 0.35 mgr. stikstof bevat, bepaald wordt met een fout van ongeveer 6.1 %, terwijl uit Staat VI blijkt, dat een hoeveelheid alanine, 2.5 maal kleiner, eveneens bepaald wordt met een fout van ongeveer 6 %. In dit laatste geval wordt nu ongeveer 0.01 mgr. stikstof te weinig gevonden. Bedenken wij, dat het bloed gemiddeld 6 mgr. amino-stikstof bevat op 100 cc. bloed, dus dat 10 cc. 0.6 mgr. levert, dan zien we dus, als de gemaakte fout op 0.01 mgr. stikstof gesteld wordt, dat in 10 cc. bloed het amino-stikstofgehalte is te bepalen met een fout kleiner dan 2 %. Wat opvalt bij Staat VI, zijn de goede uitkomsten verkregen met 0.07 mgr. alanine-stikstof, waarbij betere uitkomsten werden verkregen, dan met een tweemaal grootere hoeveelheid.

Een bezwaar, om met deze methode het aminozuur-gehalte van het bloed te bepalen, is de aanwezigheid van ureum.

Van Slyke, heeft hier echter een oplossing voor gevonden, daar bleek, dat het ureum zeer regelmatig met salpeterigzuur reageert, zoodat b.v. in 6 minuten de helft van de hoeveelheid ureum, welke in 12 minuten ontleed wordt, door het zuur wordt aangetast.

Om mij hiervan te overtuigen deed ik een paar proeven met 1 cc. van een ureum-oplossing, welke 5.6 mgr. stikstof per cc. bevatte en vond na:

6 minuten schudden 0.4229 mgr. stikstof,

12 minuten schudden 0.8491 mgr. stikstof.

In de tweede 6 minuten was dus ongeveer evenveel stikstof ontwikkeld als in de eerste 6 minuten. Verder deed ik nog een proef met deze zelfde ureum-oplossing, echter met 0.1 cc., welke dus 0.56 mgr. ureum-stikstof bevatte Hierbij werden dubbelbepalingen verricht. Zoo vond ik in de eerste 6

minuten 0.0688 en 0.0724 mgr. stikstof of gemiddeld 0.0706 mgr., terwijl in 12 minuten zich ontwikkelde 0.1315 en 0.1383 of gemiddeld 0.1349 mgr.

Inplaats van 0.1412 mgr. (2×0.0706) te vinden, vond ik dus 0.1349 of een fout van ongeveer 5 %.

Vervolgens werd nagegaan of men een bekende hoeveelheid aminozuur in een mengsel van dit zuur met ureum kan terugvinden.

Zoo vond ik met 1 cc. van de te onderzoeken vloeistof waarin 0.07 mgr. amino- en 0.56 mgr. ureum-stikstof aanwezig was:

In 6 minuten:	I. 0.1258 mgr. stikstof	}	gem. 0 1305.
	II. 0.1458 „ „		
	III. 0.1198 „ „		
in 12 minuten:	I. 0.2066 „ „	}	gem. 0.1958.
	II 0.1850 „ „		

In de eerste 6 minuten is dus aan ureum ontwikkeld $0.1958 - 0.1305 = 0.0653$ mgr., zoodat aan amino-stikstof aanwezig is: $0.1305 - 0.0653 = 0{,}0652$ mgr. Er is dus 0.0048 mgr. of ongeveer 5 % te weinig amino-stikstof gevonden.

Bij een volgende bepaling vond ik:

In 6 minuten	I. 0.1406	}	gem. 0.1403 mgr. stikstof.
	II. 0.1400		
In 12 minuten	I. 0.2054	}	gem. 0.2119 „ „
	II. 0.2184		

Zoodat dus aan amino-stikstof aanwezig is:

$0.1403 - (0.2119 - 0.1403) = 0.0689$ mgr. in plaats van 0.07, dus een fout van — 1 %.

Behalve het ureum komen nog andere stikstof-houdende stoffen in de R.N. voor en wel o.a. ammoniak, kreatine en

kreatinine. Ook hiervan werd nagegaan, hoe zij zich bij de behandeling met salpeterigzuur gedragen.

In de eerste plaats het ammoniak. Volgens VAN SLYKE reageert dit volledig in ongeveer twee uur.

Met een ammoniumchloride oplossing, welke 0.56 mgr. stikstof per cc. bevatte, kreeg ik bij 6 minuten schudden ongeveer 50 %, en na 12 minuten schudden ongeveer 85 % van de totale hoeveelheid aanwezige stikstof, waaruit dus volgt dat ammoniak met salpeterigzuur reageert, maar zoo vlug dat in de tweede 6 minuten reeds veel minder ontleed wordt, zoodat bij bepalingen van aminozuren in bloed, het aanwezige ammoniak beter eerst verwijderd kan worden.

Kreatine en kreatinine reageerden bijna geheel niet Bij 6 minuten schudden gaf kreatine 1 % van haar stikstof af en kreatinine 3 %. Daar het gehalte van het bloed aan kreatine en kreatinine zeer gering is (ongeveer 2 mgr. in 100 cc. bloed)[1]) hebben wij dus door deze stoffen geen storingen te vreezen.

Daar het bloed, alvorens volgens VAN SLYKE op amino-stikstof onderzocht te worden, eerst van eiwit bevrijd moet zijn, waarbij de mogelijkheid niet buitengesloten is, dat sporen eiwit in oplossing blijven, werd nagegaan of een eiwit-oplossing met nitriet behandeld een merkbare hoeveelheid stikstof levert. Hiertoe bracht ik in het toestel 1 cc. paardenserum en schudde gedurende 3 minuten Het bleek nu dat geen stikstof-gas uit het eiwit ontwikkeld werd.

Bepaling van de amino-stikstof in het bloed.

Na deze voorbereidende proeven werd overgegaan tot bepaling van het gehalte van het bloed aan aminozuren. Om het

---

[1]) Onderzoekingen gedaan in het Physiolog. Lab. te Utrecht **14**, vijfde reeks, 75; 1913.

bloed van eiwit te bevrijden, gebruikte ik weer een uranilacetaat-oplossing, van de samenstelling als reeds beschreven (bldz. 70).

Eerst werd nagegaan, of uranilacetaat en kaliumchloride invloed hebben op de uitkomsten. Hiertoe werd gemaakt een 0.1 norm.-oplossing van alanine, welke 1 % uranilacetaat en ruim 5 % kaliumchloride bevatte (dezelfde concentratie van deze stoffen als wanneer wij bepalingen in het van het eiwit bevrijde bloed doen) en ik vond inplaats van 1.4 mgr. alanine-stikstof, 1.38 mgr. Een ander maal vond ik in plaats van 0.7, 0.686 mgr. Hieruit volgt dus, dat noch uranilacetaat, noch kaliumchloride storend werken bij de bepalingen volgens VAN SLYKE.

Om te beginnen, werden eenige proeven genomen met het filtraat (2 cc.), verkregen nadat het bloed van eiwit bevrijd was. Daar hierbij het bloed 3 maal verdund wordt, bevat dus 2 cc. van het van eiwit bevrijde bloed $^2/_3$ cc. bloed. Op deze wijze werden geen goede uitkomsten verkregen.

Zoo vond ik b.v. bij een aantal bepalingen, dat na 12 minuten schudden zich meer dan 2 maal zooveel stikstof ontwikkeld had als in 6 minuten, zoodat dus geen aminozuren aanwezig zouden zijn, terwijl het ureum niet gelijkmatig met het salpeterigzuur gereageerd zou hebben. Voegde ik aan het bloed een bekende hoeveelheid aminozuur toe, dan kon ik deze wel terugvinden Zoo vond ik inplaats van 7 mgr. alanine-stikstof, welke ik toegevoegd had, 7.37 mgr. terug en van 7 mgr. glycocoll-stikstof 6.983 mgr.

De wisselende uitkomsten moeten toegeschreven worden aan de kleine hoeveelheden bloed, waarin het aminozuurgehalte bepaald werd. Bedenkt men voorts, dat er nog een correctie voor de ureum-stikstof aangebracht moet worden, terwijl van de gevonden waarden nog de hoeveelheid stikstof, bepaald door een blinde proef, moet worden afge-

trokken, dan is het duidelijk, dat er een menigte kleine fouten kunnen ontstaan, die van grooten invloed zijn op het eindcijfer, dat uit $^2/_3$ cc. bloed (met ongeveer 0.045 mgr. amino-stikstof) moet verkregen worden.

Om betere uitkomsten te verkrijgen moesten dus verschillende bronnen van fouten opgeheven of zoo gering mogelijk gemaakt worden. In de eerste plaats gebruikte ik meer bloed en in de tweede plaats werd het ureum verwijderd met behulp van urease. Daar in het toestel niet veel meer dan 2 cc. vloeistof onderzocht kan worden, moet dus ingedampt worden en daar het gevormde ammoniak uit het ureum, zooals wij zagen, ook met salpeterigzuur reageert, moest dit op zijn beurt weer verdreven worden.

Als volgt wordt nu te werk gegaan: 0.3 gr. gemalen sojaboonen, worden met 4 cc. water en 1 cc. van een 3 % primair kaliumphosphaat-oplossing in een kolfje gebracht en 5 minuten bij kamertemperatuur gehouden. Hierna wordt bloed toegevoegd. Hiertoe gebruikte ik bij de voorproeven 50 tot 100 cc.; later bleek, dat goede uitkomsten zijn te verkrijgen, wanneer ten minste 10 cc. bloed wordt gebruikt), goed geschud en laat men het geheel 30 minuten staan bij kamertemperatuur, waardoor al het ureum in ammoniumcarbonaat wordt omgezet. Vervolgens voegen wij de uranilacetaat-oplossing toe, centrifugeeren en filtreeren.

Van het filtraat wordt een zekere hoeveelheid genomen, hierbij 1 gr. bariumchloride gebracht en vervolgens met verzadigde baryt-oplossing alcalisch gemaakt. Verder wordt nog 3 gr. kaoline toegevoegd om eiwit, wat niet door het uranilacetaat is neergeslagen, te adsorbeeren, daarna goed geschud en door een droog filter gefiltreerd. Van dit filtraat wordt nu weer een bepaalde hoeveelheid in een uitdampschaaltje gebracht, met azijnzuur aangezuurd en boven de

vrije vlam ingedampt. Is nog ongeveer 15—20 cc. over, dan wordt met baryt de vloeistof duidelijk alcalisch gemaakt en 5—10 minuten flink gekookt om het ammoniak te verdrijven. Na afkoeling wordt dit ingedampte filtraat overgebracht in een maatglaasje en tot 10 cc. aangevuld. Hiervan wordt dan telkens 2 cc. gebruikt voor bepalingen volgens VAN SLYKE.

Als voorbeeld diene de volgende bepaling: In een Erlenmeyer-kolfje van 150 cc. wordt gebracht 0.300 gr. gemalen sojaboonen, 4 cc. water en 1 cc. primair kalium phosphaat-oplossing van 3 %. Hierna liet ik 5 minuten staan onder herhaaldelijk schudden. Vervolgens voegde ik 50 cc. geklopt runderbloed toe en liet het kolfje gedurende 30 minuten staan. Daarna werd 100 cc. van de uranilacetaat-oplossing toegevoegd en 20 minuten gecentrifugeerd. De heldere bovenstaande vloeistof werd door een droog filter gefiltreerd. Het filtraat, 80 cc., bevatte dus $\frac{50}{155} \times 80$ cc. bloed. Hieraan werd in het maatglas toegevoegd 1 gr. bariumchloride, 3 cc. verzadigde baryt-oplossing en 3 gr. kaoline, waardoor het totaal volumen 85 cc. werd. Nadat deze stoffen toegevoegd waren, schudde ik het maatglas eenige malen flink om en liet het neerslag bezinken. De heldere bovenstaande vloeistof filtreerde ik weer door een droog filter in een ander maatglas. Van dit filtraat nam ik 80 cc., bracht dit in een uitdampschaaltje van 100 cc., na met eenige druppels 30 % azijnzuur aangezuurd te hebben en dampte boven de vrije vlam in tot ongeveer 20 cc.. Daarna maakte ik de vloeistof duidelijk alcalisch en kookte 8 minuten om het ammoniak te verdrijven. Toen werd dit ingedampte en van ammoniak bevrijde filtraat overgebracht in een maatglaasje van 10 cc., het schaaltje herhaaldelijk met warm water nagewasschen (waardoor het kaliumchloride gemakkelijk oplost) en het maatglaasje bijgevuld tot 10 cc.

Met deze 10 cc. werd nu de buret van het toestel gevuld en precies 2 cc. voor een bepaling gebruikt.

In deze 2 cc. was dus aanwezig:

$$\frac{50}{155} \times 80 \times \frac{80}{85} \times \frac{1}{5} \text{ cc. bloed} = \frac{12800}{2635} \text{ cc. bloed.}$$

Na 6 minuten schudden werd ontwikkeld:

a. 0.351 cc. stikstof (temp. 16° Bar. 760) =	0.2036	mgr. stikstof
af voor correctie	0.0470	„ „
aanwezige amino-stikstof =	0.1566	„ „
b. 0.36 cc. stikstof (temp. 16° Bar 760) =	0.2088	„ „
	0.0470	„ „
	0.1618	„ „

gemiddelde van *a* en *b* is dus 0.1592 mgr. stikstof in $\frac{12800}{2635}$ cc. bloed, dus in 100 cc. bloed is:

$$\frac{2635}{128} \times 0.1592 = 3.28 \text{ mgr. amino-stikstof.}$$

Vonden wij met de methode van SÖRENSEN in 100 cc. paardenbloed meestal 6 tot 7 mgr. amino-stikstof, volgens VAN SLYKE vinden we 3.28 mgr. Het bleek later, dat dit aan de gevolgde methode was toe te schrijven.

Verder werd nagegaan of een bekende hoeveelheid aminozuur, aan het bloed toegevoegd, op deze wijze teruggevonden kon worden. Een mij onbekende hoeveelheid alanine werd aan het bloed toegevoegd.

De uitkomsten zijn samengevat in Staat VIII:

STAAT VIII.

Bepalingen van aan het bloed toegevoegde alanine volgens VAN SLYKE.

Genomen cc. bloed.	Alanine in mgr. toegevoegd.	Amino-stikstof in mgr. in 50 cc. bloed.	Amino- + alanine-stikstof.	Alanine in mgr. gevonden:	Fout in %.
50	—	1.495	—	—	—
50	21.40	—	5.010	22.37	5
50	—	1.464	—	—	—
50	15.90	—	3.949	15.82	0.6
50	—	1.800	—	—	—
50	30.00	—	6.471	29.73	0.33

Uit bovenstaanden staat blijkt dus duidelijk, dat met deze methode aan bloed toegevoegde alanine zeer nauwkeurig is terug te vinden.

Om goede uitkomsten te verkrijgen is het echter noodzakelijk, het ammoniak geheel te verwijderen; daartoe moet flink gekookt worden bij zwak alcalische reactie gedurende 8 tot 10 minuten, terwijl 1 tot 2 minuten, zooals BOCK b.v. opgeeft, niet voldoende zijn. Na 4 minuten koken zag ik een rood lakmoespapiertje zich nog blauw kleuren door het uitgedreven ammoniak, terwijl na 6 minuten geen spoor van blauwkleuring meer was waar te nemen. Om absoluut zeker te zijn, dat alle ammoniak is uitgedreven, kook ik 8 tot 10 minuten.

C. Methode van Bang.

Hoe eenvoudig deze methode op het eerste gezicht ook schijnt te zijn, bij de uitvoering stootte ik aldra op een aantal moeilijkheden, welke achtereenvolgens besproken zullen worden.

Daar men hier bepalingen doet in zeer kleine hoeveel-

heden bloed, zoodat dus ten slotte aan het einde der proef, bij de titratie, een zeer geringe hoeveelheid ammoniak gevonden wordt, ligt het voor de hand, dat men zorg moet dragen, dat de verschillende gebruikte stoffen zoo weinig mogelijk ammoniak bevatten. Voor de extractie van het ureum gebruiken wij een mengsel van alcohol absolutus en aether pro narcosi, dat in goed gesloten flesschen bewaard wordt. De extractie-vloeistof voor de aminozuren wordt volgens BANG aldus bereid: 10 gr. phosphormolybdeenzuurnatrium, dat altijd door ammoniak verontreinigd is en 10 gr. natriumsulfaat met 10 mol. kristalwater worden opgelost in 150 cc. water, waaraan 10 tot 20 druppels van een 20 percents natronloog is toegevoegd. Dit mengsel wordt in een open uitdampschaal gedurende 15 minuten gekookt, waardoor het ammoniak verdreven wordt en tot 2 L. aangevuld, nadat eerst 30 gr. zuiver geconcentreerd zwavelzuur (het gebruikte zwavelzuur was van KAHLBAUM „für forensische Zwecke") is toegevoegd. Het geheel wordt nu overgebracht in een, door behandeling met warm koningswater en uitstoomen, gereinigde flesch met hevel-inrichting. De lucht, welke in de flesch moet binnentreden, passeert een waschflesch met zwavelzuur, zoodat de inhoud niet door ammoniak der laboratoriumlucht verontreinigd kan worden. De verzadigde loog, benoodigd voor de destillatie, wordt van ammoniak bevrijd door deze gedurende een half uur onder doorleiding van ammoniakvrije lucht te koken. Deze loog wordt evenals de bovengenoemde oplossing, in een flesch met hevelinrichting en waschflesch bewaard.

De papiertjes, welke in den handel verkrijgbaar zijn, worden uitgetrokken gedurende 2 uur met een 3 percents azijnzuur-oplossing en daarna eenige uren met gedestilleerd water. Ik bewaarde de aldus gereinigde papiertjes in een exsiccator boven zwavelzuur.

De voor de eindtitratie benoodigde 0.005 norm. natriumthiosulfaat-oplossing werd bewaard in een donkerbruine flesch, welke in verbinding staat door een hevel-inrichting met de micro-buret, die bij de titratie gebruikt wordt. De lucht, welke in de flesch dringt, passeert een buis gevuld met natronkalk, waardoor koolzuur tegengehouden wordt. Op deze wijze kan men het thiosulfaat langen tijd goed houden en loopt de normaliteit slechts langzaam achteruit. Zoo was deze normaliteit op 18 November 1919 0.004454, 3 weken later op 9 December 0.004411 en 5 Januari 1920, 0.004218. Men doet het best deze thiosulfaat-oplossing elke week te stellen. Ik stelde deze oplossing met een 0.005 norm. jodium-oplossing, verkregen door kaliumbichromaat, zwavelzuur en joodkali samen te brengen.

De reacties, waarbij ten slotte het jodium vrij komt, zijn de volgende:

$$K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4 \rightarrow H_2Cr_2O_7 + K_2SO_4$$
$$H_2Cr_2O_7 \rightarrow H_2O + 2\,CrO_3$$
$$2\,Cr\,O_2 \rightarrow Cr_2O_3 + 3\,O$$
$$6\,KJ + 3\,H_2\,SO_4 \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 6\,HJ$$
$$3\,O + 6\,HJ \rightarrow 3\,H_2O + 6\,J.$$

Wij zien dus, dat één molecuul bichromaat 6 atomen jodium in vrijheid stelt, zoodat, daar het moleculair-gewicht van kaliumbichromaat 294.19 is, het zesde gedeelte hiervan genomen moet worden om één aequivalent jodium in vrijheid te stellen. Ik maakte nu een kaliumbichromaat-oplossing van 0.05 norm (0.05 × $^1/_6$ gram molecuul per liter), welke gedurende maanden bewaard kan worden. Hiertoe werd 0.6129 gr. gedroogd kaliumbichromaat opgelost in 250 cc. water. Wilde ik nu met behulp hiervan een 0.005 norm. jodium-oplossing maken, dan werd 10 cc. van deze vloeistof nauwkeurig afgemeten in een maatkolfje van 100 cc.

inhoud. Vervolgens werd ongeveer aangevuld tot 60 cc. met water, 3 cc. van een 5 percent kaliumjodide-oplossing, en 2 cc. geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Nadat zoo snel mogelijk afgekoeld was, werd bijgevuld tot 100 cc. Met deze aldus bereide 0.005 norm. jodium-oplossing werd de natriumthiosulfaat-oplossing gesteld.

Het voor het opvangen van het ammoniak benoodigde 0.005 norm. zwavelzuur werd verkregen door 2 cc. van een 0.25 norm. oplossing te verdunnen tot 100 cc. Deze oplossing werd in een met warm koningswater gereinigde en daarna uitgestoomde flesch met hevel-inrichting bewaard. 't Bleek weldra, dat deze oplossing niet constant van sterkte was te houden. Daar het ammoniak der laboratoriumlucht hiervoor niet verantwoordelijk gesteld kan worden, daar de flesch afgesloten was door een waschflesch met zwavelzuur, blijft niet anders over dan aan te nemen, dat het glas der flesch, niettegenstaande het uitstoomen, toch nog alcali afstaat. Het zwavelzuur werd gesteld, door 2 cc. ervan te pipetteeren in een ERLENMEYER-kolfje van 50 cc., water toe te voegen, 2 cc. 5 percent joodkali en 6 druppels 4 percent kaliumjodaat-oplossing, waardoor jodium in vrijheid wordt gesteld:

$$3\,H_2SO_4 + 4\,KJ + 2\,KJO_3 \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 3\,H_2O + 6\,J.$$

Dit jodium wordt dan met de thiosulfaat-oplossing getitreerd, met amylum als indicator. Ik voegde het amylum pas toe, als de gele kleur van het jodium nagenoeg verdwenen was, daar anders volgens MACLEAN een verbinding van amylum met jodium plaats heeft, waardoor (geringe) fouten kunnen worden veroorzaakt.

Ik vond nu bij het stellen van dit zwavelzuur verschillen, al naarmate ik verschillende hoeveelheden gedestilleerd water toevoegde. Zoo vond ik, dat:

2 cc. H_2SO_4 + 10 cc. H_2O overeenkwamen met 1.834 cc. 0.005 thios.
en 2 cc. H_2SO_4 + 30 cc. H_2O „ „ 1.614 cc. 0.005 „

zoodat dus zuur gebonden moest zijn door het water. Om het water nu zooveel mogelijk zuiver te krijgen, werd gedestilleerd water eerst nog eens na toevoeging van kaliumpermangaat en vervolgens het destillaat na toevoeging van baryt gedestilleerd. In het laatste geval werd de eerste hoeveelheid water (ongeveer 1 L.), welke overdestilleerde, verwijderd, daar hierin ammoniak aanwezig kon zijn en de rest opgevangen in een uitgestoomde flesch. Dit water werd elken dag opnieuw bereid, terwijl de titratie plaats greep in ERLENMEYER-kolfjes van 50 cc., die met kokend koningswater en stoom behandeld waren en opgeborgen werden in een exsiccator boven zwavelzuur Vóór het gebruik werden zij 3 maal met het gezuiverde water omgespoeld.

Eerst nù gelukte het constante waarden te vinden bij het stellen van het zwavelzuur.

Daar de reactie van zuur met jodide en jodaat niet onmiddellijk tot stand komt (volgens BANG na 5 minuten), werd eerst nagegaan, hoeveel tijd hiervoor noodig is. Hiertoe werd 2 cc. zwavelzuur met 10 cc. water, 2 cc. 5 percent kaliumjodide en 6 druppels 4 percent kaliumjodaat samengebracht en na verschillende tijden getitreerd. Het bleek nu, dat:

na 5 minuten staan 2,132 cc. norm. 0.005 normaal thiosulfaat
„ 10 „ „ 2,15 „ „ 0.005 „ „
„ 20 „ „ 2,152 „ „ 0.005 „ „
„ 30 „ „ 2,152 „ „ 0.005 „ „
„ 40 „ „ 2,155 „ „ 0.005 „ „ ,

benoodigd waren, waaruit volgt, dat na 10 minuten staan de reactie tot stand is gekomen, zoodat ik steeds

de titratie uitvoerde 10 minuten nadat jodaat en jodide waren toegevoegd.

Een volgend punt waaromtrent zekerheid verkregen moest worden, was de destillatietijd. BANG geeft op, dat

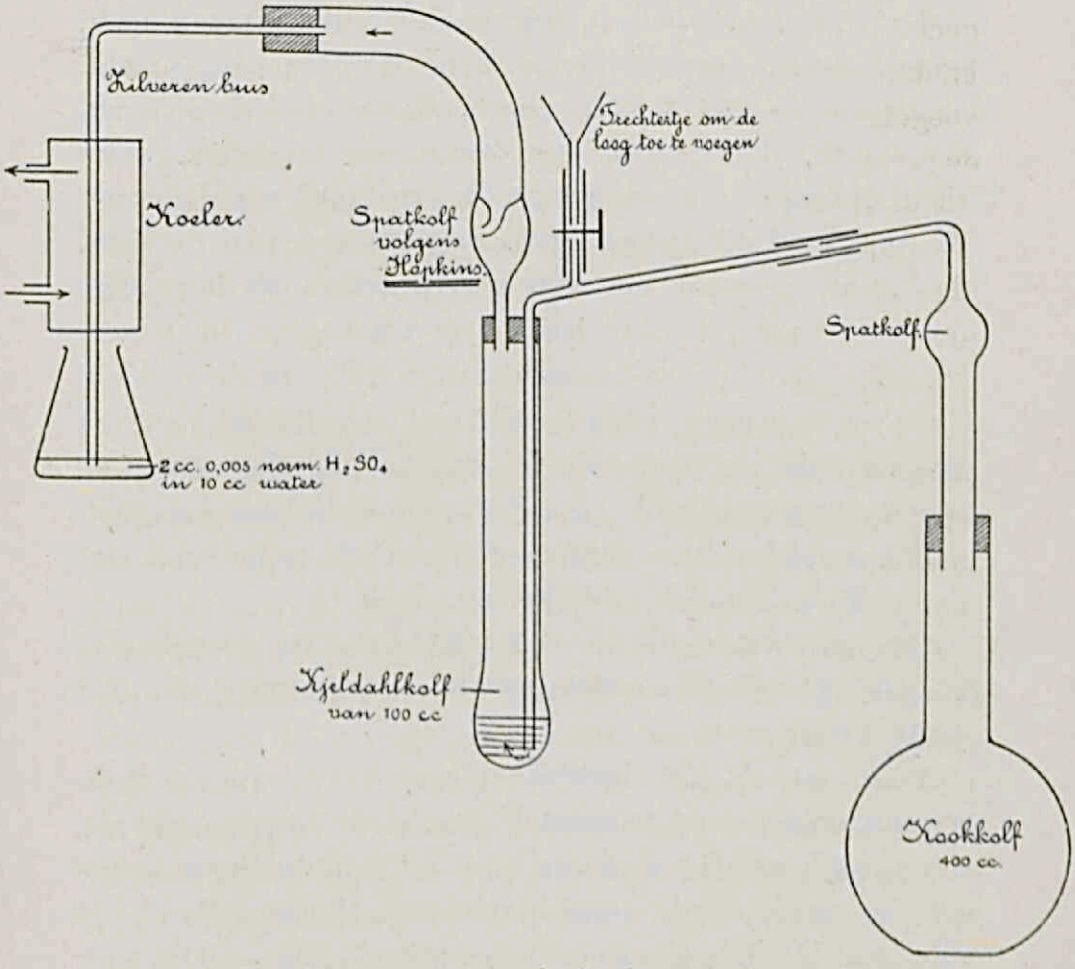


Fig. 3. Destillatietoestel gebruikt bij de methode van BANG.

na 2 minuten al het ammoniak overgedestilleerd is. Ik deed nu eenige proeven, waarbij bleek, dat na 3 minuten destilleeren geen ammoniak meer overgaat. Zoo vond ik, dat na 3 minuten 0,00721 mgr. ammoniakstikstof was overgegaan, in de volgende 3 minuten nul mgr. en in de drie hierop volgende minuten weer nul mgr., terwijl bij

een andere proef bleek, dat na 2 minuten was overgegaan 0,01869 mgr., in de volgende minuut 0,00515 mgr. en in de daaropvolgende 3 minuten nul en nog eens 3 minuten langer weer nul mgr. ammoniak-stikstof.

Wat het toestel betreft, waarin de destillatie plaats heeft, hierin werden eenige kleine veranderingen aangebracht. Gebruikte ik het toestel, zooals BANG beschreven heeft, dan bleek, dat bij het destilleeren veel condensatiewater zich ophoopte in en boven de spatkolf van HOPKINS. Hierom werd dit gedeelte wijder gemaakt en om de kans, dat alcali overspat nog geringer te maken, de inwendige buis der spatkolf naar buiten om afgebogen. Om te verhinderen, dat bij het koken van het water in de kookkolf dit over kan gaan, nam ik een kolf van 400 cc. met vrij langen hals en werd op de buis, welke de verbinding vormt tusschen kook- en KJELDAHL-kolf, nog een spatballon aangebracht, waardoor de kans, dat water overkookt in de KJELDAHL-kolf, zeer gering wordt.

Om het water in de kolf regelmatig te doen koken, voegde ik talk toe, nadat het water aangezuurd was met eenig zwavelzuur.

Vóór dat tot het eigenlijk onderzoek kon worden overgegaan, moest eerst vastgesteld worden de correctie-waarde, d.w.z. de hoeveelheid ammoniak-stikstof, welke de papiertjes en de verschillende reagentia leveren. Volgens BANG ligt de nauwkeurigheidsgrens der methode bij 0,003 mgr. stikstof, wat overeenkomt met 0,04 cc. 0.005 norm. zwavelzuur. Daar BANG nu vindt, bij zijn correctie-bepalingen, dat meestal 0.22 cc. zwavelzuur (= 0,0154 mgr. stikstof) gebonden wordt door het aanwezige ammoniak, volgt hieruit, dat bij de correctie-bepaling een fout van 18 percent gemaakt kan worden. Door dubbelbepalingen te verrichten, kan men de uitkomsten eenigszins controleeren.

Alvorens nu te kunnen overgaan tot bepalingen van het aminozuur-gehalte van het bloed, heb ik eerst eenige bepalingen omtrent de grootte van de correctie-waarde gedaan.

Zoo vond ik bij 't begin van mijn onderzoek, voordat alle bronnen van fouten, gelegen bijv. in onzuiverheden van het water, het zwavelzuur, onvolkomenheden van het toestel, of niet volkomen tegenhouden van het ammoniak uit de laboratorium-lucht zooveel mogelijk waren opgeheven, de volgende waarden uitgedrukt in mgr. stikstof:

I	0.0315	en	0.0296	(dubbelbepaling)
II	0.0370	„	0.0352	„
III	0.0430	„	0.0321	„
IV	0.0400	„	0.0293	„

Uit bovenstaande bepalingen blijkt duidelijk, dat de correctie-waarde zeer hoog is. Bedenken wij toch, dat aminozuur-bepalingen worden gedaan in ongeveer 200 mgr. bloed en dat volgens BANG het gehalte hiervan 12 mgr. op 100 gr. bloed bedraagt, zoodat in 200 mgr. ongeveer 0.024 mgr. aan amino-stikstof voorkomt, dan zien wij uit bovenvermelde getallen, dat de correctie-waarden in alle gevallen grooter waren dan de hoeveelheid stikstof, welke bij een bepaling verwacht kan worden. Dat dit nadeelig is voor de nauwkeurigheid der methode, behoeft wel geen betoog. In de tweede plaats blijkt uit bovenstaande getallen, dat dubbelbepalingen wel eens goed overeenstemmende waarden leveren, maar dat dit toch niet altijd het geval is en dat vrij groote verschillen, tot 25 percent toe, kunnen optreden.

Om mij nu in de methode te oefenen, ben ik begonnen met de totale R. N. van bloed te bepalen. Ik nam hiertoe paardenbloed en verkreeg daarmee uitkomsten, welke in Staat IX zijn samengevat.

Hierbij werden dubbelbepalingen verricht; de opgegeven waarden zijn berekend op 100 gr. bloed.

STAAT IX.

Bepaling van de hoeveelheid totale rest-stikstof in paardenbloed.

No.	Milligrammen R.N. in 100 gr. bloed		Verschil in mgr.	Verschil in %
	Bepaling I.	Bepaling II.		
1	16.97	20.62	3.65	ongeveer 14
2	13.97	15.50	1.53	„ 10
3	25.66	17.86	7.80	„ 30
4	20.56	20.76	0.20	„ 0
5	42.50	42.56	0.06	„ 0
6	20.51	20.27	0.24	„ 0
7	20.27	14.70	5.57	„ 25

Uit bovenstaanden staat blijkt, dat de totale R. N. vrij nauwkeurig is te bepalen. In 3 van de 7 proeven vond ik bij de twee bepalingen dezelfde waarde, terwijl in de overige fouten gemaakt werden van 10 tot 30 percent. Daar nu de nauwkeurigheidsgrens der bepaling volgens BANG ligt bij 0.003 mgr. stikstof en bovenstaande waarden gevonden zijn uit het verschil van twee bepalingen (totale R. N.-waarde — correctie-waarde), is dus de maximale fout welke volgens BANG gemaakt zou kunnen worden 0.006 mgr. Daar bij de berekening op 100 gr. bloed met 500 vermenigvuldigd moet worden, wanneer men uitgegaan is van 200 mgr. bloed, kan men dus tusschen twee bepalingen een verschil verwachten van 3 mgr., zoodat van bovenvermelde proeven de nummers 2, 4, 5 en 6 goed zijn te noemen, 1 op de grens ligt en 3 en 7 te groote afwijkingen vertoonen. Hiervoor kan de extractie niet verantwoordelijk gesteld worden. Zooals BANG opgeeft, is deze in 1 uur geëindigd, hetgeen ik eveneens kon aantoonen. Zoo vond ik

na één uur extraheeren 20.62 mgr. R. N. en na 3 maal 24 uur 19.98 mgr. De verschillen in uitkomsten van proef 1, 3 en 7 moeten dus gezocht worden in fouten, gemaakt bij de uitvoering, doordat niet alle voorzorgen genomen waren, die ten slotte zijn gebleken noodig te zijn.

Alvorens nu over te gaan tot de eigenlijke bepaling der aminozuur-waarde, moest nog nagegaan worden, in hoeverre het extraheeren van het ureum op de volgens BANG aangegeven wijze volledig is Volgens BANG is deze extractie na 5 uur volledig. Ik heb nu eerst een ureum-bepaling gedaan, waarbij 5 uur geëxtraheerd werd en vond hierbij, dat in 100 gr. bloed 11.15 mgr. ureum-stikstof aanwezig was. Na 24 uur extraheeren vond ik in 100 gr. van hetzelfde bloed 10.46 mgr., zoodat we aan kunnen nemen dat in 5 uur al het ureum geëxtraheerd was. Bij deze proef was de heer R. BAHLMANN zoo vriendelijk, het ureumgehalte voor mij te bepalen op een geheel andere wijze. Hij gebruikte hierbij de urease-methode [1]) en vond op 100 gr. bloed 10.5 mgr. ureum-stikstof, hetgeen dus geheel overeenkomt met de door mij gevonden waarde volgens BANG. Hieruit kunnen wij dus besluiten, dat volgens de methode van BANG het ureum geheel uit het in het papier opgezogen bloed geëxtraheerd wordt.

Nadat dit vastgesteld was, heb ik nog enkele ureum-bepalingen in paardenbloed verricht, waarbij dus 5 uren werd uitgetrokken; hierbij verkreeg ik de volgende uitkomsten medegedeeld in Staat X.

---

[1]) Ned. Tijdschr. v. Gen. **64**, I, 473; 1920.

STAAT X.

Bepalingen van de ureum-stikstof in paardenbloed volgens BANG.

Bloedmonster.	Ureum-stikstof in milligrammen in 100 gr. bloed.		
	Bepaling I.	Bepaling II.	Bepaling III.
1	13.21	11.17	10.46
2	19.84	19.92	—

Wij zien dus, dat het ureumgehalte hierbij werkelijk bepaald kan worden zonder dat de fout de bovengenoemde grens van 3 mgr per 100 gr. bloed overschrijdt. Ook KOCH [1]), die het ureum-gehalte van het bloed van zuigelingen bepaalde met behulp van de methode van BANG, geeft aan, dat goede resultaten hiermee te verkrijgen zijn. Ook hij verricht minstens twee bepalingen, maar geeft niet op, hoe groot de onderlinge verschillen zijn.

Na deze voorbereidende proeven werd overgegaan tot het bepalen der amino-stikstof-waarde. De uitkomsten zijn in Staat XI. samengevat en uitgedrukt in mgr. per 100 gr. bloed.

STAAT XI.

Bepalingen van de amino-stikstof in bloed volgens BANG.

No.	Amino-stikstof op 100 gr. bloed.				Grootste verschil in mgr.	Grootste verschil in %.
	Bepaling I	Bepaling II.	Bepaling III.	Bepaling IV		
1	17.26	16.89	—	—	0.37	ongeveer 0
2	7.78	7.50	12.64	—	5.14	„ 75
3	8.99	11.46	6.67	—	4.79	„ 50
4	14.24	15.32	12.47	16.74	4.27	„ 30
5	12.16	13.99	10.75	—	3.24	„ 30

[1]) Acad. Proefschrift, 1920, Leiden.

Wij zien dus, dat bij de aminozuur-bepalingen, het grootste verschil, dat tusschen 2 of meer bepalingen gevonden wordt, ongeveer 5 mgr. stikstof is of 66 % meer dan de fout, welke volgens BANG gemaakt mag worden.

Intusschen was mij gebleken, dat er nog een aantal bronnen van fouten waren, waarover ik boven reeds gesproken heb en ik trachtte nu deze zooveel mogelijk op te heffen.

Nadat nu alles zoo goed mogelijk in orde gemaakt was, werden eerst weer eenige bepalingen ter vaststelling van de correctie-waarden gedaan. Hierbij werden nu veel kleinere waarden gevonden, zooals men in den volgenden Staat XII kan zien:

STAAT XII.

Bepalingen van de correctie-waarde.

No.	Correctie-waarden in mgr. stikstof.	
	Bepaling I.	Bepaling II.
1	0.0201	0.0154
2	0.0055	0.0066
3	0.0054	0.0096
4	0.0045	0.0044

Uit deze getallen blijkt afdoende, dat de verbeteringen, aangebracht, doeltreffend zijn geweest. Laten wij de eerste proef buiten beschouwing, waarbij papiertjes gebruikt werden, welke gedurende eenige maanden in den exsiccator hadden gelegen, dan zien wij, dat de gemiddelde correctie-waarde nu is 0,006 mgr., terwijl deze in het begin, zonder alle voorzorgen 0,0347 mgr. bedroeg.

Vervolgens werden weer eenige aminozuur-bepalingen gedaan om te zien of nu beter overeenstemmende waar-

den waren te verkrijgen dan eerst. De uitkomsten zijn in Staat XIII samengevat.

STAAT XIII.

Bepalingen van de amino-stikstof in bloed volgens BANG.

No	Amino-stikstof in 100 gr. bloed.			Grootste verschil in mgr.	Grootste verschil in %
	Bepaling I.	Bepaling II.	Bepaling III.		
1	35	31	30	5	14
2	21	24	19	5	25
3	6.15	5.12	—	1.03	16
4	25.3	23.8	—	1.5	6

Daar deze laatste bepalingen bijna allen gedaan zijn in ongeveer 150 mgr. bloed, in plaats van in 200 mgr., moet dus het verkregen getal, voor de berekening op 100 gr. bloed, niet vermenigvuldigd worden met 500 maar met 666, zoodat de grootste afwijking, welke men binnen de nauwkeurigheidsgrenzen der methode kan verwachten is niet 3 mgr. maar $666 \times 0{,}006 = 4.3$ mgr. Nemen wij dit in aanmerking, dan kunnen bovenstaande proeven bevredigend genoemd worden.

Wat ons treft bij deze uitkomsten, is de zeer hooge aminozuur-waarde, welke gevonden wordt. Vond ik volgens de beide andere methoden in paardenbloed meestal 6 tot 7 mgr. op 100 cc., volgens BANG vind ik waarden van ongeveer 20 mgr Ik kom hier later nog op terug.

HOOFDSTUK IV.

Vergelijking der met de verschillende methoden verkregen uitkomsten.

I. Methode van Sörensen vergeleken met de methode van van Slyke.

Uit het bovenstaande is gebleken, dat zoowel de methode van Sörensen als die van van Slyke gebruikt kunnen worden om het aminozuur-gehalte van het bloed te bepalen. Inderdaad hebben dan ook verschillende onderzoekers beide methoden gebruikt, maar nergens in de literatuur heb ik vergelijkende uitkomsten van beide methoden gevonden. Daarom heb ik een aantal proeven gedaan, om de uitkomsten met beide methoden verkregen, met elkaar te vergelijken.

Werken wij met de methode van Sörensen, dan zijn de eenige stoffen, die wij in het van eiwit bevrijde bloed bepalen, aminozuren en de totale hoeveelheid ammoniak, terwijl het aanwezige ureum geen invloed heeft [1]), terwijl bij de methode van van Slyke aminozuren geheel, ureum en ammoniak gedeeltelijk mede bepaald worden.

Willen wij dus vergelijkbare waarden vinden dan moeten in het eerste geval ammoniak en in het laatste geval het ureum en ammoniak geheel verwijderd worden.

---

[1]) Voor den invloed van ureum op de formoltitratie zie L. de Jager. Zeitschr. für physiolog. Chem. **67**, 105; 1910.

Voor de methode van VAN SLYKE werd nu het bloed behandeld als opgegeven en voor een bepaling volgens SÖRENSEN als reeds vroeger beschreven.

Het bleek, dat wanneer aminozuur-bepalingen werden gedaan volgens beide methoden er groote verschillen in uitkomsten werden verkregen. De uitkomsten zijn samengevat in Staat XIV.

STAAT XIV.

Bepalingen van het gehalte aan amino-stikstof in paardenbloed volgens VAN SLYKE *en volgens* SÖRENSEN.

Bloed-monster.	Duur van koken voor ammoniak-verdrijving.	Gevonden in 100 cc. bloed volgens SÖRENSEN in mgr. stikstof.	Gevonden in 100 cc. bloed volgens VAN SLYKE in mgr. stikstof.
1	1 minuut	11.85	5.6
2	2 „	13.78	4.97
3	3 „	20.11	3.28
4	5 „	12.39	5.06
5	6 „	7.39	2.83
6	8 „	3.74	2.90
7	10 „	6.21	2.53

Uit bovenstaanden staat blijkt, dat wij met de beide methoden geheel verschillende waarden vinden waarop de uitkomsten van de proeven met paardenbloed op blz. 71 en 84 ook reeds wezen en dat vooral in de eerste 4 bepalingen de getallen zeer veel verschillen. Letten wij nu op den kooktijd, dan blijkt, dat als wij langer dan 5 minuten koken, de waarden kleiner worden, maar er toch geen overeenstemming wordt bereikt. Daar door het koken het ammoniak verdreven wordt, ligt het voor de hand aan te nemen dat in de eerste 4 bepalingen dit niet geheel het geval was. Om nu te bepalen of het verschil in uitkomsten alleen aan

het ammoniak toegeschreven moet worden, heb ik dit verwijderd in het toestel van STEIJRER, op de wijze zooals beschreven bij de aminozuur-bepalingen in de urine. Het ammoniak werd gedurende $1^1/_2$ uur bij 37° en ongeveer 20 mM. kwikdruk gedestilleerd, zoodat wij mogen aannemen, dat het geheel verwijderd was. Vervolgens werd het aminostikstof-gehalte bepaald op beide manieren en ik vond nu:

Volgens SÖRENSEN.	Volgens VAN SLIJKE.
5.60 mgr.	2.93 mgr.
12.75 „	7.90 „

Ook hier weer groote verschillen. Gebruiken wij dus uranilacetaat om het bloed van eiwit te bevrijden, dan vinden wij met beide methoden verschillende waarden en wel volgens VAN SLYKE veel minder dan volgens SÖRENSEN, terwijl uit vorige proeven gebleken is, dat toegevoegde alanine met beide methoden goed was terug te vinden.

Ik heb nu een andere manier toegepast om het bloed van eiwit te bevrijden en vervolgens bepalingen te doen met de methode van VAN SLYKE. Daarvoor gebruikte ik de methode zooals BOCK[1]) opgeeft. Deze methode is als volgt:

50 cc. bloed wordt van ureum bevrijd door urease. Vervolgens giet men het bloed in 250 cc. (5 maal de oorspronkelijke hoeveelheid bloed) kokende 0.01 norm. azijnzuur-oplossing en kookt $^1/_2$ minuut. Daarna voegt men 250 cc. kokend water toe, (een gedeelte hiervan wordt gebruikt om het vat waarin het bloed geweest is na te spoelen) en kookt 1 minuut. Hierna wordt door een droog gevouwen filter gefiltreerd en het vat waarin de coagulatie plaats had 3 maal nagespoeld met 30 cc. kokend water. Het filtraat wordt voorzichtig op de vrije vlam, of misschien beter op het waterbad ingedampt tot ongeveer 20 cc. en overgebracht

[1]) Journal of Biol. Chem. 28, 357; 1917.

in een maatkolf, welke ongeveer een inhoud heeft, die gelijk is aan het oorspronkelijke volumen bloed, dus in dit geval aan 50 cc. Daarna voegt men trichloorazijnzuur toe, zoodat de concentratie daarvan 3 % is en bovendien nog 2 gr. kaoline.

Vervolgens wordt aangevuld tot 50 cc. en goed geschud. De kolf blijft een half uur staan, waarna gefiltreerd wordt door een droog gevouwen filter. Een bepaald gedeelte van het filtraat wordt overgebracht in een uitdampschaaltje, men voegt 1 druppel alizarine toe en kookt zachtjes tot de indicator omslaat. Dit geschiedt doordat het trichloorazijnzuur verdampt, de reactie dus minder sterk zuur wordt

Daarna voegt men loog toe, zoodat de vloeistof duidelijk alcalisch is en kookt 8 minuten om het ammoniak te verdrijven. Nadat het ammoniak verdreven is, voegt men azijnzuur toe, tot de reactie weer zuur is, dampt verder in en brengt tenslotte de vloeistof op een bepaald volumen. 2 cc. hiervan worden dan gebruikt voor een bepaling volgens VAN SLYKE.

Eenige bepalingen werden nu eerst gedaan waarbij het bloed van eiwit bevrijd werd, zoowel met uranilacetaat als met trichloorazijnzuur De volgende Staat XV geeft de uitkomsten.

STAAT XV.

Bepalingen van het amino-stikstof-gehalte in bloed volgens VAN SLYKE.

Uranilacetaat, amino stikstof in 100 cc. bloed.	Trichloor-azijnzuur, amino-stikstof in 100 cc. bloed.
5.06 mgr.	6.18 mgr.
2.42 „	4.78 „
3.28 „	4.59 „

Nam ik trichloorazijnzuur, dan vond ik dus steeds hoogere waarden dan wanneer uranilacetaat gebruikt werd. Dit zou gelegen kunnen zijn in het feit, dat door uranilacetaat een gedeelte der aminozuren wordt neergeslagen.

Om hieromtrent zekerheid te krijgen, zou het wel het meest voor de hand liggen, om ook volgens SÖRENSEN, in het met trichloorazijnzuur van eiwit bevrijde bloed, het amino-stikstof-gehalte te bepalen. Dit bleek echter niet mogelijk te zijn, daar de vloeistof, waarin tenslotte de titratie uitgevoerd moest worden, sterk geel was gekleurd. Daarom werden eenige bepalingen gedaan volgens SÖRENSEN waarbij uranilacetaat voor verwijdering van het eiwit diende en volgens VAN SLYKE, waarbij het bloed van eiwit bevrijd werd met trichloorazijnzuur. Hierbij kreeg ik volgend resultaat, samengevat in Staat XVI.

STAAT XVI.

Bepalingen van het amino-stikstof-gehalte in bloed volgens SÖRENSEN *en* VAN SLYKE.

Aminostikstof in mgr. op 100 cc. bloed.	
Uranilacetaat. methode SÖRENSEN.	Trichloorazijnzuur, methode VAN SLYKE.
4.84 mgr.	5.39 mgr.
6.51 „	6.44 „

Uit bovenstaande getallen blijkt dus, dat de methode van SÖRENSEN, waarbij gebruik gemaakt wordt van uranilacetaat om het bloed van eiwit te bevrijden en de methode van VAN SLYKE waarbij trichloorazijnzuur voor het zelfde doel gebruikt wordt, gelijke uitkomsten geven.

Het verschil in uitkomsten, wanneer voor de methode van VAN SLYKE uranilacetaat in plaats van trichloorazijnzuur

gebruikt wordt, kan dus niet gelegen zijn in het feit, dat deze stoffen aminozuren neerslaan. Zooals toch reeds is aangetoond, worden noch alanine noch glycocoll door uranilacetaat neergeslagen. Het is dus niet waarschijnlijk dat deze stof andere aminozuren neerslaat. Daar BOCK nu opgeeft, dat trichloorazijnzuur geen aminozuren neerslaat en wij zien, dat gelijke uitkomsten worden verkregen, niettegenstaande wij beide stoffen voor de verwijdering van het eiwit gebruikt hebben, kunnen wij dus wel besluiten, dat de in staat XV vermelde verschillen, niet gelegen zijn in 't feit, dat uranilacetaat aminozuren neerslaat.

Waarschijnlijk lijkt het mij, dat bij de verdrijving van het ammoniak, waarbij dus 8 tot 10 minuten gekookt wordt bij alcalische reactie, aminozuren ontleed worden, daar op het laatst de temperatuur, tengevolge van het hooge kaliumchloride-gehalte der ingedampte vloeistof, zeer hoog moet zijn.

Uit de laatste bepalingen blijkt dus, dat het aminozuurgehalte van het bloed, bepaald volgens de methode van SÖRENSEN, dezelfde uitkomsten geeft als die verkregen, wanneer de methode van VAN SLYKE gebruikte wordt.

II. Methode van Bang vergeleken met de methoden van Sörensen en van van Slyke.

A priori is reeds te verwachten, dat de eerstgenoemde methode geen gelijkwaardige uitkomsten zal geven met die verkregen volgens de methoden van SÖRENSEN en van VAN SLYKE. Bepaalt men toch met deze laatste methoden alleen de stikstof, welke de amino-groep van het aminozuur-molecuul bevat, volgens BANG bepaalt men de totale R. N. — (de ureum- + ammoniak-stikstof), terwijl ook tevens bepaald wordt de totale hoeveelheid stikstof, welke in het aminozuur-molecuul aanwezig is.

Inderdaad blijkt dan ook uit de opgaven in de literatuur, dat verschillende waarden gevonden worden, al naargelang men de methode van BANG, dan wel die van SÖRENSEN of van VAN SLYKE gebruikt heeft. Vinden toch de meeste onderzoekers, welke zich van de beide laatste methoden bedienden, dat het amino-stikstof-gehalte van runderbloed ongeveer 5 tot 6 mgr. bedraagt in 100 cc., BANG geeft op, dat volgens zijn methode, dit gehalte ongeveer 12 mgr. bedraagt of 2 maal zooveel. Ditzelfde geldt ook voor menschenbloed.

Om na te gaan, of werkelijk volgens BANG zooveel hoogere waarden voor de amino-stikstof in bloed worden verkregen, dan met behulp van de beide andere methoden, heb ik eenige bepalingen verricht, om dit te onderzoeken. Daar uit mijn onderzoek gebleken is, dat met behulp van de methoden van SÖRENSEN en van VAN SLYKE, altijd overeenstemmende uitkomsten verkregen worden, heb ik de methoden meestal niet alle drie naast elkaar gebruikt, maar meestal één van de beide genoemde, naast die van BANG. De uitkomsten, hierbij verkregen, zijn in den volgenden Staat XVII samengevat.

STAAT XVII.

Bepalingen van de amino-stikstof in 100 cc. bloed volgens de drie methoden.

Bloedmonster.		Mgr. amino-stikstof in 100 cc. bloed volgens:				
		SÖRENSEN.	VAN SLYKE.	BANG [1]).		
runderbloed	1	—	5.39	10.73	14.79	dubbelbepaling.
»	2	4.93	—	13.12	13.43	»
menschenbloed	3	5.52	5.93	21.—	19 —	»
»	4	10.54	—	6.15	5.12	»
»	5	—	7.89	25.3	23.8	»

[1]) Bij de berekening is het S.G. van het bloed = 103 genomen.

Uit bovenstaanden staat blijkt duidelijk, dat werkelijk de methode van BANG veel hoogere waarden voor de amino-stikstof van het bloed geeft, dan de beide andere methoden. Verder zien wij, dat de dubbelbepalingen volgens BANG verricht, goed met elkaar overeenstemmen. Alleen de eerste bepaling wijkt iets af, daar toch is het verschil 4 mgr. stikstof, terwijl bij de vier overige bepalingen verschillen worden gevonden, die kleiner zijn dan 3 mgr. Uit deze goed overeenstemmende bepalingen, meen ik te mogen besluiten, dat de methode van BANG hier goed is uitgevoerd. Bepaling 4 is echter zeker niet betrouwbaar, hoewel goede overeenstemmende uitkomsten zijn verkregen. Dit is waarschijnlijk gelegen in het feit, dat ik hier bij de titratie, daar het steeds gebruikte kaliumjodide op was, een andere oplossing nam, welke reeds maanden lang gestaan had. Hierbij bleek, dat deze oplossing alcali bevatte, waarvoor dan ook een correctie aangebracht werd. 't Is echter niet buitengesloten, dat hierdoor een fout ontstaan is.

Hoe nu de verschillen in uitkomsten te verklaren? Men zou kunnen meenen, dat de correctie, welke aangebracht moet worden bij de methode van BANG, voor het ammoniakgehalte van papier en reagentia, te laag is geweest. Dit lijkt mij echter buitengesloten, daar bij elke proef steeds ook een dubbelbepaling is verricht om deze waarde vast te stellen, waarbij bleek, dat deze waarde zeer laag was en dat de dubbelbepalingen goed klopten. Hieruit mag ik wel besluiten, dat bij het uittrekken van de papiertjes en de verdere behandeling van de extracten geen fouten zijn begaan. Trouwens, hoeveel grooter zou de correctie-waarde wel niet hebben moeten zijn om de gevonden verschillen, aan fouten in de correctie te kunnen toeschrijven. Nemen wij b.v. de laatste bepaling van den staat, dan zien wij, dat het verschil in de uitkomsten, verkregen volgens de

methode van VAN SLYKE en van BANG, ongeveer 16 mgr. stikstof bedraagt. Daar ik bij deze bepaling ben uitgegaan van 185 mgr. bloed, moet de gemaakte fout bij de bepaling dus met 540 vermenigvuldigd zijn. De fout aldus gemaakt, zou dus overeen moeten komen met $\frac{16}{540} = 0.034$ mgr. stikstof, hetgeen overeenkomt met ongeveer 0.5 cc. 0.005 norm. thiosulfaat. Daar nu de hoeveelheid stikstof, uitgedrukt in cc. 0.005 norm. thiosulfaat, bij deze correctiebepalingen, bedroeg 0.064 en 0.065 cc., kan ik niet aannemen, dat een fout gemaakt zou zijn, welke 8 maal grooter, is dan de totale hoeveelheid, bij de bepaling van de correctie-waarde gevonden. Het gevonden verschil berust dus zeker wel niet op een te lage correctie-waarde.

Het zou ook mogelijk geweest kunnen zijn, dat de ureumextractie na 5 uur niet geëindigd was. Dat hierdoor de amino-stikstofwaarde te hoog moet worden gevonden is duidelijk. Daar echter zoowel KOCH als ik zelf aangetoond hebben, dat deze extractie na 5 uur volledig is, kan ook hierdoor het verschil niet verklaard worden.

Zonder twijfel echter, wordt het verschil voor een gedeelte tevoorschijn geroepen, door R. N.-bestanddeelen, welke mede bepaald worden. De fout, hierdoor gemaakt, kan echter niet zeer groot zijn. De voornaamste stoffen, welke op deze wijze stikstof leveren, zijn wel kreatine, kreatinine en urinezuur, terwijl stoffen, als carbaminezuur, phosphorvleeschzuur, hippuurzuur en indol, welke slechts in sporen in het bloed aanwezig zijn, wel geen groote fout kunnen geven.

Volgens opgaven van BEKER [1]) vindt men in het bloed ongeveer 2.5 mgr. kreatinine en kreatine, welke 0.92 mgr.

---

[1]) Onderzoekingen gedaan in het Physiolog. Lab. te Utrecht **14**, vijfde reeks, 75; 1913.

stikstof leveren en volgens COHEN TERVAERT [1]) bevat het bloed op 100 cc. ongeveer 3 mgr. urinezuur met 1.1 mgr. stikstof. Voor zoover op 't oogenblik is na te gaan, wordt dus bij de amino-stikstof-bepalingen volgens BANG, altijd minstens 2 mgr. te veel bepaald, welke niet van aminozuren afkomstig is. Dit zou overeenkomen bij de bepaling met ongeveer 0.004 cc. thiosulfaat, terwijl, zooals wij boven zagen, verschillen van 0.5 cc. zijn gevonden. Dit in aanmerking nemend, zijn dus de groote verschillen ook hierdoor niet te verklaren.

Er blijft dus niet veel anders over, dan te besluiten, dat de verschillen te voorschijn worden geroepen door de aminozuren zelf. Bepaalt men toch volgens de methode van SÖRENSEN of van VAN SLYKE van elk aanwezig aminozuur, slechts één atoom stikstof, volgens BANG bepaalt men de totale hoeveelheid stikstof, die de aminozuren bevatten, zoodat dus de waarde volgens BANG gevonden, afhangt van den aard der aminozuren, die op dat oogenblik in het bloed aanwezig zijn. Dat werkelijk de aard der aminozuren, hierbij een belangrijke rol speelt, blijkt ook al uit de opgaven van BANG zelf, die in menschenbloed waarden vindt schommelend tusschen 3 en 22 mgr., terwijl BOCK en ook mijn eigen onderzoek aangetoond hebben, dat dit gehalte ongeveer constant is en ligt tusschen 5 en 7 mgr. Ten slotte is het wel zeer opmerkelijk, dat BANG na eiwitvoeding geen verhooging, maar een verlaging van het amino-stikstof-gehalte van het bloed vindt, terwijl toch bijna alle onderzoekers en ook ik zelf, zooals nog medegedeeld zal worden, een verhooging konden waarnemen. Ik zou dit willen verklaren, door aan te nemen, dat

---

[1]) Onderzoekingen gedaan in het Physiolog. Lab. te Utrecht **18**, vijfde reeks, 251; 1917.

door de eiwitvoeding de aard der aminozuren in het bloed gewijzigd wordt, waarbij dan de aminozuren met veel stikstof-atomen, door de weefsels opgenomen of met de urine afgescheiden worden, terwijl aminozuren met weinig stikstof in het bloed blijven

Wat dus de methode van BANG betreft, kan ik besluiten, dat het amino-stikstof-gehalte, volgens deze methode gevonden, steeds hooger is, dan wanneer volgens de methode van SÖRENSEN of van VAN SLYKE onderzocht werd en dat dit waarschijnlijk gelegen is in den aard der aminozuren.

Hoeveel tijd en moeite ik mij tenslotte ook gegeven heb, om de waarde van de methode van BANG zoo volledig mogelijk te leeren beoordeelen, met zekerheid durf ik nog niet te besluiten dat deze methode geschikt, noch dat zij ongeschikt is ter bepaling van het aminozuur-gehalte van het bloed. Verder onderzoek, waarvoor de tijd mij ontbreekt, is ongetwijfeld gewenscht. Temeer, daar deze methode, mocht zij ten slotte toch bruikbaar blijken, groote voordeelen biedt. Immers, alleen met behulp van haar zou het mogelijk zijn, een stelselmatig onderzoek naar het gehalte van het bloed aan amino-stikstof, bij gezonden en zieken, te verrichten, daar voor deze methode slechts enkele druppels bloed noodig zijn, terwijl voor de beide andere methoden zooveel bloed noodig is, dat steeds venae punctie verricht moet worden.

HOOFDSTUK V.

Het amino-stikstof-gehalte van het bloed onder verschillende omstandigheden.

Ik heb bij een aantal gezonde menschen onder verschillende omstandigheden en bij een aantal zieken, het amino-stikstof-gehalte van het bloed bepaald, zooveel mogelijk zoowel met de methode van SÖRENSEN als met die van VAN SLYKE. Op deze wijze kon dan worden nagegaan, in hoeverre met deze beide methoden overeenstemmende uitkomsten verkregen worden, waardoor dan nog weer nader de betrouwbaarheid bij de toepassing onder verschillende omstandigheden kon worden beoordeeld, terwijl daarenboven nog eens nauwkeurig het gehalte van het bloed aan amino-stikstof bij gezonde personen onder verschillende omstandigheden werd onderzocht; zooals b.v. de invloed van een eiwitrijken maaltijd, waaromtrent verschillende meeningen bestaan, nog eens kon worden vastgesteld.

I. Invloed van een eiwitrijken maaltijd op het amino-stikstof-gehalte van het bloed bij normale personen.

Als eiwitrijken maaltijd heb ik de proefpersonen vleesch en eieren laten eten. Ik ging hierbij over het algemeen als volgt te werk. Kort na het ontbijt, waarbij geen stik-

stofhoudende voedingsmiddelen gebruikt waren, werd door venae punctie een hoeveelheid bloed verkregen, wisselend tusschen 10 en 100 cc. en hierin, zoo mogelijk volgens beide methoden, het amino-stikstof-gehalte bepaald

Tevens werd in de urine, geloosd onmiddellijk na het ontbijt, eveneens het amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bepaald. Den volgenden morgen kregen de proefpersonen een eiwitrijken maaltijd, bestaande uit biefstuk en eieren. Eenige uren na den maaltijd, wisselend tusschen 3 en 6 uur, werd weer venae punctie gedaan en in het verkregen bloed het amino-stikstof-gehalte bepaald, zoo mogelijk volgens beide methoden. Verder werd de urine verzameld, geloosd de eerste 5 uur na den maaltijd en ook van de daarop volgende 5 uur en hiervan het amino-stikstof-gehalte bepaald, waardoor een indruk wordt verkregen omtrent de afscheiding van aminozuren na eiwitvoeding.

De resultaten van dit onderzoek zijn in Staat XVIII samengevat.

Uit deze proeven blijkt, dat het bloed van verschillende personen, onderzocht vóór en nà een eiwitrijken maaltijd met de methoden van SÖRENSEN en van VAN SLYKE, zeer goed overeenstemmende uitkomsten geeft. Het grootste verschil, dat tusschen de uitkomsten der beide methoden gevonden werd, bedroeg 0.85 mgr. stikstof (proef 3). De bepaling werd hier verricht in 25 cc. bloed, zoodat de fout met 4 is vermenigvuldigd. Bij de bepaling volgens SÖRENSEN kan dus een fout gemaakt zijn van $\frac{0.85}{4} = 0.21$ mgr. stikstof hetgeen overeenkomt met 0.075 cc. 0.2 norm. baryt Daar nu de grens der nauwkeurigheid gelegen is bij 0.1 cc. baryt, valt het gevonden verschil dus binnen de nauwkeurigheidsgrens der methode.

Verder zien wij, dat na eiwitvoeding het gehalte aan

STAAT XVIII.

Bepalingen van het amino-stikstof-gehalte van bloed en urine, vóór en nà een eiwitrijken maaltijd.

N°. Proef-persoon.	Amino-stikstof in mgr. in 100 cc. bloed.				Bloed genomen aantal uren na den maaltijd.	Verhooging amino-stikstof gehalte na eiwitvoeding in %	Amino-stikstof in mgr. in 100 cc. urine.			Hoeveelheid urine in cc. afgescheiden eerste 5 uur na den maaltijd.	Hoeveelheid urine in cc. afgescheiden tweede 5 uur na den maaltijd.	Totale hoeveelheid amino-stikstof met de urine afgescheiden in mgr.	Genomen voedsel.
	Nuchter bepaald volgens:		Na eiwitvoeding bepaald volgens:				Nuchter	na eiwitvoeding.					
	SÖRENSEN.	V. SLYKE.	SÖRENSEN.	V. SLYKE.				eerste 5 u.	tweede 5 u.				
1. S.	9.83	9.04	9.35	—	6	0	10.84	43.48	43.48	295	495	342.5	350 gr. biefstuk en 3 eieren.
2. H.	5.82	5.27	—	6.91	5	25	23.67	48.26	52.—	370	285	326.5	200 gr. biefstuk en 4 eieren.
3. F.	—	5.09	7.71	6.86	$3^1/_2$	43	—	53.07	56.11	160	250	214.8	250 gr. biefstuk.
4. T.	6.84	6.66	7.48	7.46	3	14	16.89	22.19	—	190	—	—	300 gr. biefstuk en 2 eieren.
5. SCH.	5.52	5.93	10.54	—	$3^1/_2$	84	—	27.10	25.94	250	315	149.4	300 gr. biefstuk en 3 eieren.
Gemiddeld	6.70		8.04										

aminozuren in het bloed meestal verhoogd is. In proef 1 is dit niet het geval en is dit gehalte ongeveer gelijk gebleven. Hierbij evenwel is pas 6 uur [1]) na den maaltijd bloed genomen, zoodat, daar in de andere gevallen, waarbij het bloed onderzocht werd 3 tot 5 uur na den maaltijd steeds een verhooging is gevonden, mij het waarschijnlijk lijkt, dat in dit geval de resorptie van aminozuren uit den darm grootendeels had opgehouden en dat de weefsels het overtollige aminozuur aan de circulatie hadden onttrokken.

De verhooging van het aminozuur-gehalte blijkt verder, zooals te verwachten was, niet altijd even groot te zijn. Afgezien van proef 1, bedroeg deze verhooging in de overige gevallen, van 14 tot 84 %. Het komt mij voor, dat wij hier te doen hebben met bijzonderheden van de verschillende proefpersonen. Bij den één is de voortbeweging van het voedsel en de snelheid der ontleding anders dan bij een ander. De zeer sterke stijging, gevonden bij proefpersoon 5, berust mijns inziens dan ook wel hierop, dat wij hier toevalligerwijze vrijwel, bij het nemen van het bloedmonster, dat oogenblik getroffen hebben, waarop de sterkste resorptie van aminozuren plaats vond, terwijl deze bij proefpersoon 1 en 3 nagenoeg geheel geëindigd was. Reeksen proeven, waarbij om het half uur bloed wordt onderzocht, zouden hieromtrent nadere opheldering kunnen verschaffen. Ook de proeven van DOBROWOLSKAJA wijzen er op, zooals reeds eerder gezegd, dat werkelijk op een gegeven oogenblik een maximale resorptie is waar te nemen.

Wat aangaat de afscheiding van aminozuren met de

---

[1]) Zoo geeft GOCHT op, dat na 6 uur bismuthpap bijna geheel in het coecum is aangekomen en dat nog slechts zeer kleine hoeveelheden in het onderste gedeelte van het ilium aanwezig zijn. Handbuch der Röntgen-Lehre, blz. 286.

urine, hierbij blijkt, dat in nuchteren toestand van de proefpersoon de urine amino-stikstof bevat en in deze 5 gevallen wisselende tusschen 10 en 23 mgr. in 100 cc., terwijl verder blijkt, dat dit gehalte na eiwitvoeding soms belangrijk, soms minder sterk verhoogd is en dat deze verhooging 10 uur na den maaltijd nog is waar te nemen. Een gedeelte van de geresorbeerde aminozuren wordt dus weer met de urine afgescheiden, terwijl het gehalte aan amino-stikstof van de urine, afgescheiden de eerste 5 uur en de tweede 5 uur na den maaltijd vrijwel gelijk is. Daar nu, zooals uit proef 1 blijkt, na 6 uur het aminozuur-gehalte van het bloed weer normaal is, maar de urine, welke na dien tijd afgescheiden wordt, aminozuren in verhoogde mate bevat, ligt het voor de hand aan te nemen, dat de weefsels het te veel aan aminozuren langzamerhand weer aan het bloed afstaan, welke dan ten deele weer met de urine afgescheiden worden. Hieruit zou dan volgen, dat de nieren in staat moeten zijn, zeer snel de aminozuren aan het bloed te onttrekken, daar wij anders een verhooging van het aminozuur-gehalte van het bloed zouden moeten vinden, hetgeen, zooals proef 1 ons leert, niet het geval is.

Stellen wij verder, dat het stikstof-gehalte van 't versche magere vleesch ongeveer 3.4 % (Voit) is, dan bevat dus 100 gr. biefstuk 3.4 gr. amino-stikstof. Rekenen wij verder, dat een ei ongeveer 3 gr. eiwit bevat, dan levert één ei ongeveer 0.5 gr. stikstof.

Zoo is dus bij proef 1 met het voedsel opgenomen 13.4 gr. stikstof, terwijl met de urine in totaal is afgescheiden 342.5 mgr. of ongeveer 2.5 %, wanneer wij aannemen, dat al de in het voedsel aanwezige stikstof, als amino-stikstof aanwezig is. Dit nu is zeker niet het geval, zoodat de afscheiding van aminozuren in dit geval zeker meer is dan 2.5 %. Hoeveel dit dan wel is, laat zich moeilijk be-

rekenen, daar dan de aard der aminozuren bekend zou moeten zijn.

Wij kunnen dus uit deze proeven besluiten, dat bij gezonde menschen, na een eiwitrijken maaltijd, wanneer op een geschikt oogenblik (in elk geval niet meer dan 6 uur na den maaltijd) het aminozuur-gehalte van het bloed onderzocht wordt, dit gehalte verhoogd is en dat dezelfde verhooging wordt gevonden met de methode van SÖRENSEN als met die van VAN SLYKE.

Verder blijkt, dat na 6 uur de resorptie van eiwit uit den darm waarschijnlijk heeft opgehouden en dat een klein gedeelte der aminozuren, van uit den darm opgenomen, weer met de urine wordt afgescheiden.

II. Het amino-stikstof-gehalte van het bloed onder eenige pathologische omstandigheden.

In de eerste plaats heb ik onderzocht het bloed van eenige patiënten, lijdende aan diabetes mellitus. Bij dezen toestand toch is de stofwisseling gestoord en wel, al naar den ernst van het geval, meer of minder sterk. In het bijzonder is de stofwisseling der koolhydraten bij deze ziekte anders dan bij normale menschen. Verder kunnen, zooals met zekerheid is aangetoond, bij de zwaardere gevallen van diabetes, koolhydraten uit eiwit ontstaan.

Men zou zich kunnen voorstellen, dat aangezien men meent, dat in de zware gevallen van diabetes, de koolhydraten minder goed kunnen worden verbrand, aminozuren ten deele hun plaats innemen, zooals DELAUNAY meent, dat deze laatste stoffen bij de Cephalopoden de plaats innemen, die de glucose heeft voor de hoogere dieren. Aan den anderen kant kunnen, zooals wij reeds zeiden, bij de zware

gevallen van diabetes koolhydraten uit eiwit worden gevormd, zooals men dit ook zeer duidelijk heeft kunnen aantoonen langs experimenteelen weg bij dieren, waarbij men b. v. een phloridzine-glycosurie heeft te voorschijn geroepen. In deze gevallen ontstaan de koolhydraten uit aminozuren; men heeft b.v. gevonden, dat uit alanine, glucose kan worden gevormd. Men zou dan kunnen verwachten, dat in het eerste geval, waarbij aminozuren min of meer in de plaats van glucose komen, het gehalte van het bloed aan aminozuren verhoogd wordt. In het tweede geval echter, waarbij de aminozuren in belangrijke mate worden omgezet in koolhydraten, zou het gehalte van het bloed aan deze stoffen verlaagd kunnen zijn.

Ik heb dan ook het gehalte van het bloed aan aminostikstof bij een viertal diabetes-lijders onderzocht. Het waren geen zware gevallen, bij allen kon het suikergehalte der urine, door een doelmatig diëet, in korten tijd binnen de normale grenzen worden gebracht. Mijn onderzoekingen zijn verricht bij deze patiënten, nadat zij het diëet een aantal dagen hadden gehouden en de afscheiding van suiker met de urine normaal was geworden. Het was dus te verwachten, dat geen zeer groote verschillen in het aminostikstof-gehalte van het bloed dezer patiënten, vergeleken met dat van normale personen, zouden worden gevonden, hoewel het gehalte van het bloed aan reduceerende stoffen, bij minstens 3 van de 4 patiënten nog aanzienlijk verhoogd was. Ik laat hier de voor ons belangrijke punten uit de ziektegeschiedenissen volgen, benevens de door mij verkregen uitkomsten.

1. A.V. Diagnose: Diabetes mellitus (adipositas).
Bloedsuikergehalte 2.1 °/₀₀. Diëet: E(iwit) 66 gr.; V(et) 101 gr.; K(oolhydraten) 107 gr. Bij dit diëet

werd de urine suikervrij, geen aceton. Totale hoeveelheid afgescheiden ammoniak in 24 uur 0.431 gr.

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bloed: **8.79** mgr. (VAN SLYKE).

2. S. Diagnose: Diabetes mellitus. (Amputatie rechter been wegens gangreen der voet en abscesvorming in bovenbeen).

Urine bevat weinig suiker, geen aceton.

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. arteriëel bloed, tijdens de operatie opgevangen: **6.6** mgr. (SÖRENSEN), en van het veneuse bloed **11.46** mgr.

Een vergelijking tusschen het amino-stikstof-gehalte van het arteriëele en het veneuse bloed is hier niet mogelijk, daar het laatste met pus en weefselvocht verontreinigd was. In elk geval blijkt hier wel uit, dat weefselvocht of etter vrij belangrijke hoeveelheden amino-stikstof bevatten.

3. d. R. Diagnose: Diabetes mellitus.

Bloedsuikergehalte 2 °/$_{oo}$. Diëet E. 85; V. 126; K 62.

Bij dit diëet werd de urine suikervrij, maar bevatte een spoor aceton. Totale hoeveelheid afgescheiden ammoniak in 24 uur 0.75 gr.

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bloed: **5.83** mgr. (VAN SLYKE).

4. C. Diagnose: Diabetes mellitus.

Bloedsuikergehalte 1.94 °/$_{oo}$. Diëet E. 86; V. 105; K. 121. Bij dit diëet was het suikergehalte der urine slechts weinig verhoogd; geen aceton. Totale hoeveelheid afgescheiden ammoniak in 24 uur 0.7 gr.

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bloed: **6** mgr. (VAN SLYKE).

Het bloed van patienten 2, 3 en 4 is onderzocht des ochtends, zeer kort na het ontbijt, zoodat kan worden aangenomen, dat de gevonden waarden overeenkomen met die in nuchteren toestand. Bij patient 1 is dit niet zeker het geval. Uit het onderzoek van bovengenoemde patienten blijkt nu, dat bij patient 1 het gehalte vrij hoog is, maar ik zou hieruit toch niets durven besluiten, terwijl bij de andere 3 gevallen de waarden zich bewegen tusschen de grenzen door mij bij gezonde, nuchtere personen gevonden. Werkelijk is dus bij deze 4 patienten geen afwijking gevonden, wat betreft het amino-stikstof-gehalte van het bloed, maar zooals gezegd, het waren patienten met betrekkelijk lichte graden van diabetes mellitus. Overigens vond ook Bock in 2 gevallen van diabetes, 7.8 en 6.63 mgr. op 100 cc. bloed, dus eveneens normale waarden, maar omtrent den ernst van zijn gevallen, geeft hij niet de minste bijzonderheden, hoewel zijn wijze van bepaling, n.l. volgens van Slyke, waarbij het bloed van eiwit bevrijd wordt door koken en behandeling met trichloorazijnzuur, zooals ik boven uitvoerig uiteengezet heb, zeer betrouwbaar is.

Daar mij geen bloed ter beschikking stond van zwaardere gevallen van diabetes, kon ik het amino-stikstof-gehalte van het bloed onder die omstandigheden niet nagaan, hetgeen zeer jammer is, daar juist bij deze gevallen wellicht afwijkingen te voorschijn komen, die dan van beteekenis zouden kunnen zijn voor de beoordeeling van den toestand der eiwitstofwisseling. Het is ten zeerste gewenscht, dit onderzoek bij dergelijke patienten voort te zetten, hetgeen nu, nadat de methoden door mij nauwkeurig zijn nagegaan, vrij gemakkelijk mogelijk is. Een bepaling kan reeds op zeer betrouwbare wijze geschieden in 10 cc. bloed. Mij ontbrak daartoe voorloopig, zooals gezegd, de gelegenheid.

Daarentegen heb ik wel nog een tweetal patienten met

leveraandoeningen kunnen onderzoeken. Bij deze aandoeningen zou men eveneens wijzigingen van het amino-stikstof-gehalte van het bloed kunnen verwachten. Zooals ook reeds is medegedeeld, is het juist bij deze aandoeningen, dat men het eerst aminozuren in het bloed heeft gevonden en dus moet hierbij het gehalte zeer verhoogd zijn geweest. De lever speelt dan ook ongetwijfeld een zeer voorname rol bij de eiwitstofwisseling, daar zij in de eerste plaats aminozuren kan desamideeren en omzetten in ketozuren, in de tweede plaats ook het vermogen bezit, aminozuren te vormen uit ketozuren en ammoniak, waarbij dan de ketozuren ook uit koolhydraten afkomstig kunnen zijn. Al naar den aard van de stoornis in de functies van de lever en den algemeenen toestand van de stofwisseling van den patient, kan men verschillende afwijkingen in het gehalte van het bloed aan amino-stikstof verwachten.

Wanneer het vermogen van de lever, aminozuren te desamideeren min of meer verloren is gegaan, kan eene verhooging van het aminozuur-gehalte van het bloed worden verwacht, die dan door een minder goede werking der nieren nog aanzienlijk verhoogd zou kunnen worden. Van de twee patienten, die ik onderzocht, was de leveraandoening bij de eerste zeker minder ernstig dan bij den tweeden. Het bloed werd bij nuchteren toestand der patienten onderzocht.

Hieronder volgen de voor ons belangrijke punten uit de ziektegeschiedenissen:

5. D. Diagnose: icterus ten gevolge van obstructie der galwegen door steenen.

Patiente ziet sinds 3 weken geel. Bij de operatie bleek de lever een weinig cirrhotisch te zijn.

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bloed: **8.67** mgr. (SÖRENSEN) en **8.51** mgr. (VAN SLYKE).

6. P. Diagnose: cirrhosis hepatis c. ictero.

Patient ziet sinds zes jaar geel. Lever vergroot, niet hobbelig. Milt niet vergroot. Urine: Urobilinegehalte verhoogd, galkleurstoffen niet aanwezig. (Patient is opgenomen wegens ademhalingsbezwaren tengevolge van emphyseem der longen).

Amino-stikstof-gehalte van 100 cc. bloed: **5.74** mgr. (VAN SLYKE).

Wij zien dus, dat bij de eerste patient het aminozuurgehalte een weinig hoog is, bij den tweeden daarentegen zeker niet. In deze beide gevallen is dus het gehalte van het bloed aan amino-stikstof niet of nauwelijks gewijzigd. Evenwel, voortgezet onderzoek bij patienten, ook met leveraandoeningen is ten zeerste gewenscht en de uitkomsten kunnen, zoowel voor de physiologie als voor de pathologie van veel beteekenis worden. Daarbij moet dan ook weer rekening worden gehouden, niet alleen met den toestand van de lever, maar ook met die van de andere organen en van het geheele organisme.

Ten slotte was het mij mogelijk het bloed te onderzoeken van een patient lijdende aan nephritis. Zonder twijfel hebben de nieren een belangrijke rol te vervullen bij de eiwitstofwisseling; men denke slechts aan de verhooging van het rest-stikstof-gehalte bij de verschillende vormen van nephritis, waarop NEUBERG en STRAUSS, zooals reeds is medegedeeld, wezen. Het spreekt dan ook wel haast van zelf, dat men reeds lang getracht heeft de verschillende componenten, welke de rest-stikstof van het bloed leveren, onder deze pathologische omstandigheden na te gaan. Zoodoende zijn dan ook reeds een aantal onderzoekingen verricht over het amino-stikstof-gehalte van bloed en urine bij nieraandoeningen waarbij bleek, dat bij sommige dezer

aandoeningen vooral als zij gepaard gingen met uraemie, het gehalte van deze stof in het bloed zeer belangrijk verhoogd kon zijn. Zoo wil ik hier nog vermelden de bepalingen van Bock [1]), die bij een groot aantal personen lijdende aan verschillende vormen van nephritis, het amino-stikstof-gehalte van het bloed bepaalde. Hij vond hierbij waarden wisselend tusschen 5.90 en 29.98 mgr., waarbij wel opmerkelijk is, dat deze uiterste waarden gevonden zijn tijdens uraemie. Jammer genoeg geeft Bock geen enkele bijzonderheid omtrent den toestand der patienten, zoodat geen inzicht verkregen kan worden in de beteekenis van het aminozuur-gehalte in elk bepaald geval. Wel zou men uit deze wisselende getallen kunnen besluiten, dat de toestand van de nier van groot belang is voor het gehalte van aminozuren in het bloed. Vele vraagstukken omtrent de functie van de nier dringen zich hier aan ons op, niet alleen wat betreft de aminozuren, maar ook wat betreft de andere rest-stikstof-bestanddeelen van het bloed. Zoo zou men na kunnen gaan b. v. de retentie in het bloed der verschillende R. N.-bestanddeelen bij de verschillende soorten van nephritis, waarbij nu eens overwegend de glomeruli, dan weer meer het parenchym met de tubuli zijn aangedaan. Als ideaal onderzoek zou zich daarbij dan moeten aansluiten het pathologisch-anatomisch onderzoek, zoodat een volledig overzicht zou kunnen worden verkregen in de bijzondere veranderingen, welke de nier in elk speciaal geval vertoont. Hierdoor dan zou het mogelijk zijn een inzicht te krijgen in de beteekenis, die de verschillende secerneerende deelen van de nier, voor de verschillende in het bloed aanwezige stoffen hebben. Reeds Bang [2]) heeft in dit opzicht belangrijk werk verricht,

[1]) Journ. of Biol. Chem. **29**, 198; 1917.

[2]) Bioch. Zeitschr. **72**, 1917.

door na te gaan het ureum- en amino-stikstof-gehalte van het bloed bij verschillende kunstmatig verwekte nier-aandoeningen. Wil men echter dit onderzoek met vrucht verrichten, dan lijkt het mij absoluut noodzakelijk de techniek der methoden ter bepaling van de verschillende R. N.-bestandeelen van het bloed, in bloed en urine, volkomen te beheerschen.

Ik was in staat bij den patient, lijdende aan nephritis, het aminozuur-gehalte van bloed en urine te bepalen, zoowel, nadat patient gedurende 3 dagen een stikstofvrije voeding had gehad, als nadat hij gedurende 6 dagen gewone, gemengde ziekenhuiskost had gekregen. Het bloed werd onderzocht, terwijl de patient in nuchteren toestand was, terwijl van de urine verzameld in 24 uur, in 100 cc. het amino-stikstof-gehalte bepaald werd, zoodat, daar de totale hoeveelheid urine in 24 uur afgescheiden bekend was, een inzicht werd verkregen omtrent de aminozuur-afscheiding in 24 uur. Hieronder volgen eenige aanteekeningen uit de ziektegeschiedenis.

7. B. Diagnose: arteriosclerotische schrompelnier.

Patient, 60 jaar, klaagt over moeheid, hoofdpijn. duizeligheid. Bloedsdrukking 180 mM. Hoog ureumgehalte van het bloed. Urine: weinig eiwit en vormelementen. Diurese ± 2 L. per dag.

Amino-stikstof-gehalte van het bloed per 100 cc.: (nadat patient 3 dagen lang een stikstofvrij diëet heeft gehad) **7.89** mgr. (VAN SLYKE) en van de urine per 100 cc. **17.33** mgr.

Na gemengde kost waren deze getallen voor het bloed: **7.5** mgr. (VAN SLYKE), **7.99** mgr. (SÖRENSEN) en voor de urine **63.93** mgr.

Wij zien dus bij dezen patient, dat het amino-stikstof-gehalte van het bloed slechts weinig hooger is dan bij normale personen en dat het gebruik van stikstofhoudende voedingsmiddelen, geen invloed heeft op het amino-stikstof-gehalte van het bloed, wanneer dit des ochtends in nuchteren toestand wordt onderzocht.

Aan den anderen kant echter zien wij, dat het amino-stikstof-gehalte van de urine belangrijk verhoogd is. Was dit toch bij stikstofvrije voeding 17.33 mgr., nadat eiwit aan de voeding was toegevoegd, bedroeg dit gehalte 63.93 mgr. of nog ongeveer 10 mgr. meer als ik ooit vond in de urine na een sterke eiwit-voeding. Daar de diurese bij de eerste bepaling bedroeg 2 L. en bij de tweede 1.8 L. is dus afgescheiden met de urine in totaal 346.6 mgr. en 1151 mgr. amino-stikstof. Ik elk geval is wel duidelijk, dat een belangrijk gedeelte van het opgenomen eiwit, weer in den vorm van aminozuren wordt afgescheiden.

Men zou zich kunnen denken, dat door de arteriosclerose ook de lever geleden heeft, waardoor zij niet meer in staat is aminozuur aan de circulatie te onttrekken en te desamideeren, terwijl men eveneens zou kunnen aannemen, dat de weefsels minder gemakkelijk, aminozuren van uit het bloed opnemen. Nadere onderzoekingen, waarbij het amino-stikstof-gehalte van het bloed en de urine bij zulke patienten bepaald wordt onder verschillende omstandigheden, zooals na het toedienen van grootere of kleinere hoeveelheden eiwit, zullen hieromtrent ongetwijfeld nadere opheldering kunnen verschaffen.

Behalve deze pathologische gevallen, waarbij het mij mogelijk was het bloed op amino-stikstof te onderzoeken en welke ik dank aan de vriendelijkheid van Prof. Hijmans van den Berg, Prof. Lameris en Dr. Wolvius van het Militair Hospitaal, die mij zeer welwillend, waar bij deze

patiënten toch venaepunctie moest worden verricht, in de gelegenheid stelden dit bloed te onderzoeken, terwijl ik eveneens Dr. ENGELKES, die de punctie's verrichtte, mijn dank betuig, was ik nog in de gelegenheid, door de welwillendheid van Prof. KOUWER en de hulp van Dr. STEYNS, waarvoor ik ook hen mijn erkentelijkheid wil betuigen, om het placentaire bloed op amino-stikstof te onderzoeken. Hierbij had ik vooral het oog om naast het bloed uit de vena umbilicalis ook dat uit de arteriae umbilicales te onderzoeken en te zien of er een verschil in het aminozuur-gehalte van beide bloedsoorten was te vinden. Daar toch het bloed der vena umbilicalis de voedingsstoffen voor de vrucht bevat en deze voor het vormen van nieuw weefsel zeker stikstofhoudende stoffen in groote hoeveelheid noodig heeft, kan men verwachten dat het bloed der vena umbilicalis aminozuren bevat en waarschijnlijk wel meer, dan onder normale omstandigheden in het moederlijk bloed wordt aangetroffen, terwijl wij eveneens kunnen verwachten, dat de weefsels der vrucht, uit dit voedingsbloed onder meer de aminozuren tot zich nemen, zoodat het bloed der arteriae umbilicales minder amino-stikstof zou bevatten, dan dat der vena, zooals dan ook RABINOWITCH (zie bl. 40) vond. Tot mijn spijt echter heb ik alleen het bloed der vena op amino-stikstof kunnen onderzoeken, daar het niet mogelijk was uit de arteriae een genoegzame hoeveelheid bloed voor onderzoek te verkrijgen.

In één geval vond ik, dat dit bloed bevatte 8.88 mgr. amino-stikstof op 100 cc. bloed en in het tweede geval 6.46 mgr., beide malen bepaald volgens VAN SLYKE.

Wij zien dus uit deze bepalingen, dat het amino-stikstofgehalte der vena umbilicalis in het eerste geval hooger is, dan onder normale omstandigheden in nuchterbloed wordt

gevonden en dat dit in het laatste geval ongeveer gelijk is. Ook Bock heeft placentair bloed onderzocht en vindt in 100 cc. bloed van 6.78 tot 12.15 mgr., met een gemiddelde van 9.48 mgr.

In hoever of de voeding van de moeder hier invloed heeft op het amino-stikstof-gehalte van het bloed uit de vena umbilicalis, laat zich moeilijk beoordeelen, hoewel dit zeker van belang is voor de kennis van de wisselwerking, welke bestaat tusschen moederlijk- en foetaalbloed, b.v. of hier een eenvoudige filtratie, dan wel een secerneerende werking in het spel is, dan wel of de trophoblast, welke zeer zeker proteolytische enzymen bevat, misschien lichaamseiwit afbreekt en de daardoor ontstane aminozuren in de foetale circulatie overgaan.

Zoo zien wij dus, dat het onderzoek van bloed en urine op amino-stikstof, niet alleen waarde heeft voor een goed begrip der eiwitstofwisseling, maar dat ook vele andere problemen, waarvan ik een paar voorbeelden noemde, wel niet hierdoor opgelost, maar toch misschien nader tot oplossing zullen worden gebracht.

CONCLUSIES.

1. Zonder twijfel bevat het bloed van mensch, paard en rund aminozuren in meetbare hoeveelheid. Voor den mensch vond ik voor dit aminozuur-gehalte, uitgedrukt in mgr. amino-stikstof per 100 cc. in nuchteren toestand, gemiddeld **6.8** mgr., met schommelingen tusschen **5.5** en **9.45** mgr.

2. Het amino-stikstof-gehalte van het bloed laat zich nauwkeurig bepalen zoowel met de methode van SÖRENSEN als met die van VAN SLYKE. Met beiden zijn, voor zoover ik heb kunnen nagaan, onder zeer verschillende omstandigheden, gelijke uitkomsten te verkrijgen, indien men zorgt alle bronnen van fouten zooveel mogelijk op te heffen. De verschillen, gevonden, liggen binnen de nauwkeurigheidsgrenzen der methoden.

3. Met de methode van SÖRENSEN kan men in 25 cc. bloed, met de methode van VAN SLYKE nog in 10 cc., het amino-stikstof-gehalte voldoende nauwkeurig bepalen.

4. Met de methode van SÖRENSEN, de eenige die ik hiervoor gebruikt heb, kan men zeer nauwkeurig het amino-stikstof-gehalte der urine bepalen.

5. Volgens BANG bepaalt men niet de amino-stikstof der aminozuren, maar de totale hoeveelheid stikstof in het aminozuur-molecuul aanwezig, terwijl bovendien nog stikstof mede bepaald wordt, welke niet van aminozuren afkomstig is, zoodat volgens deze methode steeds hoogere waarden gevonden worden, dan volgens de beide anderen. Zoo vond ik met de methode van BANG 2 tot 4 maal zooveel amino-stikstof als volgens SÖRENSEN of VAN SLYKE in bloed van verschillenden oorsprong, uitkomsten die vrijwel overeenstemmen met die, welke BANG zelf heeft opgegeven. Daarenboven biedt de methode vele technische moeilijkheden.

6. De waarde van de methode van BANG, voor de bepaling van het amino-stikstof-gehalte van het bloed, zal door nader onderzoek moeten worden vastgesteld, waarbij dan b.v. zal moeten worden nagegaan of onder sommige omstandigheden, zooals na een eiwitrijken maaltijd, een even groote stijging van het aminozuur-gehalte, uitgedrukt in percenten, zoowel volgens BANG als volgens één der andere methoden bepaald, zal worden gevonden.

7. Na eiwitvoeding is, voor zoover ik de gelegenheid had dit na te gaan, het amino-stikstof-gehalte van het bloed van den mensch meestal verhoogd. De verhooging, uitgedrukt in percenten, hangt af van het tijdstip waarop het bloed na den maaltijd wordt onderzocht. Hierbij lijkt het waarschijnlijk, dat na 6 uur de resorptie van aminozuren uit den darm vrijwel heeft opgehouden.

8. Na eiwitvoeding is het aminozuur-gehalte der urine verhoogd. Ik vond bijv. een verhooging in een geval van 10 tot 44 mgr. per 100 cc urine.

9. Bij eenige lichte gevallen van diabetes kon ik geen noemenswaardige veranderingen in het amino-stikstofgehalte van het bloed waarnemen.

10. Bij een geval van geelzucht was het amino-stikstofgehalte eenigszins verhoogd; bij een patiënt met cirrhotische veranderingen in de lever, welke waarschijnlijk 6 jaar bestonden, was geen verandering in dit gehalte waar te nemen.

11. Bij een patiënt met schrompelnier was het amino-stikstofgehalte van het bloed iets hooger, dan bij normale menschen nuchter gevonden wordt. Dit gehalte was hetzelfde, zoowel bij stikstofvrij diëet, als bij gemengde voeding, maar een belangrijk deel van het opgenomen eiwit werd weer met de urine afgescheiden in den vorm van aminozuren.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

Het amino-stikstof-gehalte van het bloed laat zich zeer nauwkeurig bepalen met de methode van SÖRENSEN en met de methode van VAN SLYKE.

II.

Noch trichloorazijnzuur noch uranilacetaat slaan aminozuren neer.

III.

Een specifieke werking van radiumstralen op zenuwweefsel is niet aangetoond.

IV.

De eiwitstoffen aanwezig in gerst, haver, rogge en tarwe zijn volwaardig.

V.

Het verdient aanbeveling bij de cataract-operatie de orbicularis-oculi door novocaine inspuiting paretisch te maken.

VI.

Partieele extirpatie van de mediale meniscus van het kniegewricht is een ondoelmatige operatie.

VII.

Zwangerschap is trophoblast werking.

VIII.

Bij de behandeling van het maligne-granuloom is Röntgenbestraling niet aangewezen.

IX.

Het geneeskundig school-toezicht ten plattelande worde opgedragen aan den medicus ter plaatse.

X.

De vermindering der catalase-werking bij de chloroformnarcose berust op beschading der catalase door de, in het methaan gesubstitueerde chloor.

XI.

De Magnus-de Kleyn'sche reflexen kunnen waarschijnlijk voor de behandeling van contracturen na pyramidenbaanlaesie, van groot belang zijn.

XII.

Voor prognose en therapie van hartziekten, is het functioneele hartonderzoek van het grootste belang.